



HAL
open science

Comprendre la diversité génétique de *Toxoplasma gondii* au Bénin au travers de ses hôtes et de son génome : des influences humaines et environnementales

Azra Hamidovic

► To cite this version:

Azra Hamidovic. Comprendre la diversité génétique de *Toxoplasma gondii* au Bénin au travers de ses hôtes et de son génome : des influences humaines et environnementales. Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges, 2020. Français. NNT : 2020LIMO0047 . tel-03491865

HAL Id: tel-03491865

<https://theses.hal.science/tel-03491865>

Submitted on 18 Dec 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Limoges

ED 615 - Sciences Biologiques et Santé (SBS)

UMR Inserm 1094 Neuroépidémiologie Tropicale, associée IRD

Thèse pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Limoges

Santé publique, épidémiologie, environnement et sociétés

Présentée et soutenue par

Azra Hamidović

Le 17/12/2020

**Comprendre la diversité génétique de *Toxoplasma gondii* au Bénin
au travers de ses hôtes et de son génome : des influences
humaines et environnementales**

Thèse dirigée par Pr. Marie-Laure Dardé et Dr. Aurélien Mercier

JURY :

Rapporteurs

Mme Anne-Laure Bañuls, Directeur de Recherche à l'IRD, Unité MIVEGEC UMR IRD 224-CNRS-5290, Université de Montpellier

M. Dominique Aubert, Maître de Conférence des Universités, HDR, Praticien Hospitalier Parasitologie-Mycologie, Laboratoire de Parasitologie – Mycologie Pôle de Biologie Territoriale, Université de Reims

Examineurs

M. Daniel Ajzenberg, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier Parasitologie – Mycologie, UMR Inserm 1094 Neuroépidémiologie Tropicale, Université de Limoges

M. Gauthier Dobigny, Chargé de Recherche à l'IRD, CBGP, Université de Montpellier

Mme Marie-Laure Dardé, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier Parasitologie – Mycologie, UMR Inserm 1094 Neuroépidémiologie Tropicale, Université de Limoges

M. Aurélien Mercier, Maître de Conférences des Universités Parasitologie - Mycologie, UMR Inserm 1094 Neuroépidémiologie Tropicale, Université de Limoges

À mes parents, Almira et Rešad,
Hvala vam puno, jer vi ste to omogućili.

- Ahwan wε nɔ gbɔ, co e nɔ dɔ ahwan xo*
- *C'est quand la guerre s'arrête que l'on raconte la guerre.*
Proverbe fongbé (Bénin)

Remerciements

Je tiens d'abord à exprimer toute ma reconnaissance à mes encadrants de thèse de m'avoir donné l'opportunité de faire ce travail de thèse, de m'avoir formée et encadrée pendant ces trois années. Merci pour toutes vos discussions scientifiques, mais aussi votre soutien.

Un grand merci au Pr. Marie-Laure Dardé de sa bienveillance, son implication, ainsi que ces précieux conseils. Ce fut un honneur de travailler avec un grand nom de la recherche sur la toxoplasmose tel que vous.

Je remercie le Dr. Aurélien Mercier de m'avoir donné le goût du travail de terrain, pour sa disponibilité et son expérience. Ce que nous avons découvert au Bénin nous a surpris mais cela m'a permis de m'autoriser à spéculer (un peu).

Je remercie également Nicolas Plault pour toute l'aide apportée sur certains protocoles franchement laborieux, Roselyne Mouzet pour sa bonne humeur lors des conseils de laboratoire et Martine Gatet pour son aide sur certains protocoles et ces délicieux chocolats.

Merci à Homayoun Riahi de conserver mes souches au CRB *Toxoplasma* mais aussi pour sa formation sur la congélation des souches et sa bonne humeur.

Je remercie chaleureusement le Pr. Bertrand Courtioux, qui a toujours veillé en tant que Directeur de l'ED 615 que ma thèse se déroulait convenablement. Merci aussi pour toutes les opportunités concernant mon futur projet professionnel.

Merci au Pr. Pierre-Marie Preux pour son accueil au sein de l'équipe mais également au sein du conseil de laboratoire comme représentante des doctorants.

Je tiens à remercier les deux rapporteurs de cette thèse, le Pr. Anne-Laure Bañuls et le Dr. Dominique Aubert pour avoir accepté de juger ce travail. Je remercie également le Pr. Daniel Ajzenberg de faire partie de ce jury. Merci au Dr. Jean-Benjamin Murat, invité officieux, de m'avoir initiée à la recherche.

Ce travail de thèse n'aurait pas pu voir le jour à l'excellente collaboration que nous avons eu avec l'IRD Bénin, le CBGP et le laboratoire d'Expérimentation Animale de la FSS.

Un énorme merci à Gauthier Dobigny, d'avoir accepté d'être examinateur de cette thèse, mais également pour toute l'aide et pour son soutien pendant mon terrain au Bénin. Il a été le premier à m'accueillir sur place et s'est démené pour que l'installation du laboratoire se fasse au mieux. Un grand merci aussi à Gualbert Houémènou pour son accueil à l'EPAC.

Merci à Florent Engelmann de nous avoir accueillis au sein de l'IRD en nous facilitant toutes les démarches, à André Garcia pour son accueil au CERPAGE à la FSS, à Pépin et Firmine pour les manips. Un grand merci à Nadine Fievet pour son aide, son soutien et ses encouragements. Merci également au Pr. Dorothe Kinde Gazard de m'avoir prêté son laboratoire pour mes manipulations.

Je remercie également le Pr. Anatole Laléyé et Marius Adjagba de nous avoir fourni une animalerie, élément indispensable à notre protocole, Honoré Da Zoclanclounon pour tous les bons moments passés en manips et Constant Djokpe pour l'aide à l'entretien.

Je n'oublie pas de remercier toutes les personnes que j'ai pu rencontrer pendant ma mission : Jonas, à qui je souhaite plein de courage pour sa thèse et que j'espère revoir en France (ou au Bénin !); Sylvestre de m'avoir accueilli dans son village pour mes prélèvements et chez qui j'ai eu ma première poule séropositive après des semaines d'inquiétude; Arétas pour toute son aide sur le terrain; Laurine et Valentin, mes accolytes d'aventures à bord de zemidjans (voire un seul pour nous trois + le chauffeur); Richard, bon courage pour ton travail; Japhète et Fréjus grâce à qui j'ai pu voyager pour mes différents terrains; et j'embrasse tous les autres amis du Bénin ☺

Merci également à tous les propriétaires et chefs de village qui nous ont autorisés à venir échantillonner chez eux.

Un énorme merci à tous les employés de la Guesthouse Les Cocotiers à Cotonou où j'ai vécu pendant six mois et tout particulièrement à Armelle, ma maman africaine, d'avoir été là pour moi et de m'avoir cuisiné de superbes petits plats.

Merci à Karine Berthier et Sylvain Piry pour leur aide précieuse sur les analyses de génétiques de populations pour notre article sur le Bénin et de m'avoir hébergé pendant les journées Rongeurs de 2019.

Je remercie Frédéric Arieu pour la collaboration sur les séquençages de génomes de *T. gondii*.

Je pense également à mes amis doctorants du bureau 340 avec qui nous avons beaucoup voyagé via Photoshop: Lokman, pour toutes les pistes de travail, discussions scientifiques et fous rires en jouant à Just Dance (on remercie aussi ta femme pour ses pâtisseries qui nous ont souvent remontées le moral !); Clotilde, maman kitten, tu es un réel modèle de réussite et de persévérance. J'ai tant appris à tes côtés et maintenant je ne te souhaite que du bonheur au soleil; Noudy, courage à toi aussi pour cette fin de thèse (et félicitations d'avance ☺); et enfin le grand docteur Julien ! Bien-sûr je remercie aussi Marion,

Emilie, Andrea, Antoine, Jaime, Mayoura, et tous les autres. Un merci particulier à Salmane et Inès qui m'ont accueilli dans leur pays natal avec tant de gentillesse.

Je remercie les étudiants qui ont participé à cette thèse, Camille, Elodie, Océane, Maeva, Roxane, Marie-Hélène et Pacôme.

Je remercie tous mes amis de Bretagne et d'ailleurs, Shona, Emma, Alexia, Lucie B., Laura, Elodie, Claire, Linda et Lucie L. pour les soirées Top Chef, Mégane, Matthieu, Marie-Pauline (courage à ceux qui sont en thèse !), Nadège et Alex, mais spécialement mon chaton Fanny pour toutes ses heures au téléphone à me changer les idées 😊

Un grand merci à mes parents, Almira et Rešad, qui m'ont transmis l'amour des sciences, des voyages (Papa, je me vanterai toujours des trois tampons sur mon passeport de pays que toi tu n'as pas visité :p) et la force de mener mes travaux sur le terrain en me soutenant quotidiennement malgré les milliers de kilomètres qui nous ont séparés. Ces remerciements seraient incomplets si je ne remerciais ma petite sœur Alisa, mon entomologiste et humoriste préférée, qui se dirige également vers le monde de la recherche. Je ne peux que t'y souhaiter tout l'épanouissement du monde et tu verras, ton âme de chercheuse te mènera exactement là où tu le voudras.

Enfin, je remercie mon compagnon Anthony, sans qui cette thèse n'aurait pas été la même. Tu es passé par cette épreuve l'année dernière (à un jour près !) et tu savais exactement ce que je pouvais ressentir pendant ces deux dernières années et comment me rassurer. C'est dire qu'entre mes doutes, mon stress et la crise sanitaire, tu en as eu du boulot ! En tout cas, ton soutien inconditionnel pour mon futur projet professionnel me va droit au cœur et je n'ai qu'une hâte : te rejoindre pour de nouvelles aventures !

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Table des matières

Liste des publications	13
Liste des communications orales.....	15
Introduction	16
Chapitre I. Contexte bibliographique et objectifs de la thèse	18
I.1. Généralités sur le parasite <i>Toxoplasma gondii</i>	18
I.1.1. La découverte du toxoplasme.....	18
I.1.2. Cycle de transmission	19
I.1.3. La toxoplasmose	20
I.1.3.1. La toxoplasmose animale.....	20
I.1.3.2. Données générales sur la toxoplasmose humaine : épidémiologie et aspects cliniques.....	21
I.1.4. La diversité génétique du toxoplasme dans le monde	22
I.1.4.1. Les outils d'analyse et leur évolution.....	22
I.1.4.2. Tour du monde de la diversité génétique	26
I.2. Focus sur l'Afrique	28
I.2.1. Epidémiologie et formes cliniques	28
I.2.1.1. Le problème de la toxoplasmose oculaire en Afrique	28
I.2.1.2. Les cas africains de toxoplasmose sévère	29
I.2.2. La diversité génétique du toxoplasme en Afrique	30
I.2.3. Présentation du Bénin	32
I.2.3.1. Géographie	32
I.2.3.2. Situation géopolitique du Bénin.....	34
I.2.3.3. Climat.....	35
I.2.3.4. Population.....	35
I.2.3.5. Histoire précoloniale et coloniale.....	36
I.3. Problématique et objectifs de cette thèse.....	39
Chapitre II. Diversité génétique de <i>Toxoplasma gondii</i> au Bénin	41
II.1. Introduction.....	41
II.2. Principaux résultats.....	41
II.3. Article original	43
II.4. Données supplémentaires	73
Chapitre III. Etude de la prévalence moléculaire de <i>Toxoplasma gondii</i> chez des rongeurs et autres micromammifères du Bénin	74
III.1. Introduction	74
III.2. Matériel et méthodes.....	75
III.2.1. Echantillonnage	75
III.2.1.1. Présentation des sites d'échantillonnage	76
III.2.1.2. Micromammifères capturés	77
III.2.2. Dissection.....	79
III.2.3. Sérologie sur buvards.....	79
III.2.4. Analyses génétiques : Extraction d'ADN, qPCR (prévalence moléculaire) et géotypage à l'aide des microsatellites (15 MS).....	80
III.2.5. Analyses statistiques	80
III.2.6. Comité d'éthique et protocole de Nagoya	81
III.3. Résultats.....	81

III.3.1. Séroprévalence	81
III.3.1.1. Concordance séroprévalence et prévalence moléculaire	81
III.3.2. Comparaison des conditions de stockage : congélation <i>versus</i> éthanol.....	82
III.3.3. Prévalence moléculaire détaillée selon l'espèce, l'organe et le quartier.....	82
III.3.4. Génotypes.....	83
III.4. Discussion	83
III.5. Données complémentaires.....	86
Chapitre IV. A la recherche d'introgessions dans le génome de <i>Toxoplasma gondii</i>	89
IV.1. Introduction.....	89
IV.1.1. Description du génome du toxoplasme	89
IV.1.2. Mécanismes impliqués dans la diversité génétique de <i>Toxoplasma gondii</i>	90
IV.1.3. Le volet génomique du projet Introtox	91
IV.2. Matériel et méthodes	92
IV.2.1. Séquençage des génomes.....	92
IV.2.2. Comparaison des séquences avec simPLOT.....	93
IV.2.3. Identification précise des portions communes des génomes comparés	93
IV.3. Résultats	94
IV.3.1. Comparaison des séquences avec simPLOT.....	94
IV.3.2. Caractérisation de l'origine des chromosomes	97
IV.4. Discussion	99
IV.5. Données complémentaires	102
Chapitre V. Discussion générale et perspectives.....	104
V.1. Méthodologie.....	104
V.1.1. Les enjeux et contraintes d'une mission de terrain en zone tropicale humide....	104
V.1.2. Les forces et limites de notre protocole	105
V.1.2.1. L'échantillonnage des volailles domestiques.....	105
V.1.2.2. L'échantillonnage des rongeurs sauvages	106
V.1.2.3. Limites de ces échantillonnages	107
V.1.2.4. L'utilisation des souris SWISS dans le protocole d'isolement.....	107
V.1.3. Limites des microsatellites	108
V.2. La structuration de la diversité génétique du toxoplasme au Bénin et dans le monde : avancées et perspectives	108
V.2.1. Le rôle de la souris domestique dans le cycle de <i>Toxoplasma gondii</i> et sur sa diversité.....	109
V.3. Perspectives de travail.....	109
V.3.1. Etudes expérimentales.....	109
V.3.2. Etudes de terrain.....	110
V.3.3. Stratégies pour la suite des études en génomique	110
Références bibliographiques	112
Littérature scientifique.....	112
Annexes	126

Table des illustrations

Figure 1 : Vente de volailles et chatons à Cotonou.....	17
Figure 2 : <i>Ctenodactylus gundi</i>	18
Figure 3 : Alfonso Splendore (à gauche) et Charles Nicolle (à droite).....	18
Figure 4 : Cycle de vie et transmission du toxoplasme	19
Figure 5 : Arbre de Neighbor-Joining réalisé à partir de 62 génomes de <i>T. gondii</i>	26
Figure 6 : Répartition géographique des génotypes 15 MS de <i>Toxoplasma gondii</i>	27
Figure 7 : A. Lésion toxoplasmique récente B. Lésion toxoplasmique cicatricielle.....	28
Figure 8 : Distribution géographique de souches de <i>Toxoplasma gondii</i> en Afrique	31
Figure 9 : Carte du Bénin avec les lieux d'échantillonnage lors du travail de terrain (encadrés).....	32
Figure 10 : Photos de A. Cotonou, B. Lac Nokoué bordant Cotonou, C. Vestiges de la route des esclaves à Ouidah, D. Centre-ville de Parakou, E. Tata Somba (Habitations traditionnelles au Nord-Ouest du Bénin et Togo) sur la route de Boukoubé.....	33
Figure 11 : Zones de vigilance renforcée.....	34
Figure 12 : Carte du climat béninois selon la classification de Köppen	35
Figure 13 : A. Cartographie du nombre total d'esclaves déportés, leur origine et leur destination entre le 16 ^e et 19 ^e siècle ; B. Cartographie de la destination précise des esclaves entre le 18 ^e et 19 ^e siècle.....	37
Figure 14 : Statue le long de la Route des Esclaves.....	38
Figure 15 : La Porte du Non-Retour à Ouidah, monument commémoratif construit au bout de la Route des Esclaves pour les millions de personnes déportés lors de la traite négrière.....	38
Figure 16 : Zones d'échantillonnage des rongeurs à Cotonou	76
Figure 17 : Les différents espèces de rongeurs et autres micromammifères capturés dans cette étude	77
Figure 18 : Répartition géographique des différents genres de rongeurs et autres micromammifères.....	79
Figure 19 : Schématisation circulaire du génome de <i>T. gondii</i> basé sur la souche de référence ME49. Les grandes familles de protéines ont été représentées par des cercles de couleurs et sont réparties sur l'ensemble du génome.....	89
Figure 20 : Comparaison de TgCatBr09 (référence) aux 11 génomes Africa 1	94
Figure 21 : Comparaison de TgCatBr26 (référence) aux 11 génomes Africa 1	94
Figure 22 : Comparaison de TgCatBr34 (référence) aux 11 génomes Africa 1	95
Figure 23 : Comparaison de TgCatBr72 (référence) aux 11 génomes Africa 1	95
Figure 24 : Comparaison de TgCkBr141 (référence) aux 11 génomes Africa 1	96
Figure 25 : Arbres de Neighbor-Joining comprenant des souches Africa 1 et la souche brésilienne.....	97

Figure 26 : Arbre de Neighbor-Joining comprenant des souches Africa 1 et la souche brésilienne.....	98
Figure 27 : Arbres de Neighbor-Joining comprenant des souches Africa 1 et la souche brésilienne.....	98
Figure 28 : Signalisation cellulaire des mécanismes impliqués dans la virulence de <i>T. gondii</i>	101
Figure 29 : Comparaison par chromosomes du génome entier de TgCatBr09 à des souches classées Amazonian, Africa 1, Type II et Type III	103

Table des tableaux

Tableau 1 : Correspondance de génotypes de <i>Toxoplasma gondii</i> en fonction de différentes techniques (Séquençage de génomes complets, MLST, PCR-RFLP et 15 MS) et leur origine géographique (adapté de Galal et al., 2019b).....	24
Tableau 2 : Protocole de dilutions en cascade pour une sérologie sur sérobuvars	80
Tableau 3 : Séroprévalence vis-à-vis de <i>T. gondii</i> selon l'espèce	81
Tableau 4 : Prévalence moléculaire de <i>T. gondii</i> selon l'hôte, l'organe et le quartier	82
Tableau 5 : Echantillons génotypés, localisation géographique, génotype et taille des marqueurs microsatellites.....	83

Liste des publications

En lien direct avec cette thèse:

A. Hamidović, J. R. Etougbéché, A. B. N. Tonouhewa, L. Galal, G. Dobigny, G. Houemenou, H. Da Zoclanclounon, R. Amagbégnon, A. Laleye, N. Fievet, S. Piry, K. Berthier, H. F. J. Pena, M.-L. Dardé, A. Mercier, « **A hotspot of *Toxoplasma gondii* Africa 1 lineage in Benin: How new genotypes from West Africa contribute to understand the parasite genetic diversity worldwide** ». accepté dans PLOS Neglected Tropical Diseases

Autres articles sur la thématique:

K. Račka, E. Bártoová, J. Juránková, **A. Hamidović**, I. Kucharovičová, B. Šimek, A. Kočišová, « **Fatal toxoplasmosis in wild European brown hares (*Lepus europaeus*): poses risk of infection for humans?** ». accepté dans Transboundary and Emerging Diseases

L. Galal, C. Stragier, F. Boumédiène, **A. Hamidović**, O. Maugrion, M.-L. Dardé, A. Mercier, « **Combining spatial analysis and host population genetics to gain insights into the mode of transmission of a pathogen: The example of *Toxoplasma gondii* in mice** ». Infection, Genetics and Evolution (2020); Vol 78 104142. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.104142>

L. Galal, **A. Hamidović**, M.-L. Dardé, M. Mercier, « **Diversity of *Toxoplasma gondii* strains at the global level and its determinants** ». Food and Waterborne Parasitology (2019); Vol 15 e00052. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2019.e00052>

L. Galal, A. Sarr, T. Cuny, C. Brouat, F. Coulibaly, M. Sembène, M. Diagne, M. Diallo, A. Sow, **A. Hamidović**, N. Plault, M.-L. Dardé, D. Ajzenberg, A. Mercier, « **The introduction of new hosts with human trade shapes the extant distribution of *Toxoplasma gondii* lineages** ». PLOS Neglected Tropical Diseases (2019); 13:e0007435. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007435>

A. Sarr, L. Galal, F. Boumediene, **A. Hamidović**, M.-L. Dardé, M. Diallo, A. Sow, Y. Niang, T. Cuny, A. Mercier. « **Seroprevalence and Risk Factors of *Toxoplasma gondii* Infection in Free-Range Chickens in Senegal, West Africa** ». Vector-borne and Zoonotic Diseases (2019); Vol 20 p15-21. <http://doi.org/10.1089/vbz.2019.2481>

A. B. N. Tonouhewa, R. Amagbégnon, S. P. Atchadé, **A. Hamidović**, A. Mercier, M. Dambrun, F. Migot-Nabias, Y. Sissinto Savi de Tové, H. Sahibi, M. Laboudi, S. Sahidou, M.-L. Dardé · D. Kindé-Gazard · S. Farougou. « **Séroprévalence de la toxoplasmose chez les femmes enceintes au Bénin méta-analyse et métarégression** ». Bulletin de la Société de Pathologie exotique (2019) ; Vol 112 n°2 p79-89. <http://doi:10.3166/bspe-2019-0078>

L. Galal, G. Schares, C. Stragier, P. Vignoles, C. Brouat, T. Cuny, C. Dubois, T. Rohart, C. Glodas, M.-L. Dardé, M. Kane, Y. Niang, M. Diallo, A. Sow, D. Aubert, **A. Hamidović**, D. Ajzenberg, A. Mercier. « **Diversity of *Toxoplasma gondii* strains shaped by commensal communities of small mammals** ». International Journal for Parasitology (2018); Vol 49 p267-265. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.11.004>

L. Galal, D. Ajzenberg, **A. Hamidović**, M.-F. Durieux, M.-L. Dardé, A. Mercier, « **Toxoplasma and Africa: One Parasite, Two Opposite Population Structures** ». Trends in Parasitology (2017); Vol 32 p140-154.<https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.10.010>

P. Chaichan, A. Mercier, L. Galal, A. Mahittikorn, F. Arieu, S. Morand, F. Boumédiène, R. Udonsom, **A. Hamidović**, J.-B. Murat, Y. Sukthan, M.-L.Dardé, « **Geographical distribution of *Toxoplasma gondii* genotypes in Asia: A link with neighboring continents** ». Infection, Genetics and Evolution (2017); Vol 53 p 227-238.<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.06.002>

Liste des communications orales

International Toxoplasma Congress (Toxo XV), Juin 2019, Quindio (Colombie).
Présentation poster « Did maritime trade between Europe and West Africa influence *T. gondii* genetic diversity? » (Annexe 8)

Séminaire thématique de l'ED 615 Biosanté, Mars 2019, Mézières en Brenne (36).
Présentation orale

Semaine du Cerveau 2019 : conférence devant des lycéens sur « **Les pires compagnons pour notre cerveau: ces parasites qui embrouillent l'esprit** ». Mars 2019, Lycée Beaupeyrat (87)

Séminaire thématique de l'ED 615 Biosanté, Mars 2018, Cussac (87). Flash Poster

Prix:

- **2nd Best Poster** de Frontiers in Microbiology pour le poster « **Did maritime trade between Europe and West Africa influence *T. gondii* genetic diversity?** », International Toxoplasma Congress (Toxo XV), Juin 2019, Quindio (Colombie)
- **Meilleur flash poster** pour « **Phénomènes d'introgession dans la diversité génétique du toxoplasme entre la France et l'Afrique de l'Ouest et Centrale : des influences humaines et environnementales** » au Séminaire thématique de l'ED 615 Biosanté, Mars 2018, Cussac (87)

Introduction

Retrouvé sur tous les continents, le parasite *Toxoplasma gondii* mériterait amplement la médaille du pathogène le plus ubiquiste. Ce protozoaire intracellulaire appartient à la sous-classe des coccidies et au phylum des *Apicomplexa* au même titre que l'agent du paludisme, *Plasmodium spp.* Le toxoplasme est capable en théorie d'infecter tous les homéothermes (mammifères et oiseaux) et est responsable d'une zoonose, la toxoplasmose. Chez l'humain, la prévalence de l'infection à *T. gondii* est estimée à un tiers de la population mondiale (Montoya et Liesenfeld, 2004), et souvent l'infection est asymptomatique chez l'immunocompétent. Cependant, l'expression clinique de la maladie varie selon différents facteurs. Par exemple, la morbidité est faible en Amérique du Nord et en Europe, sauf chez certaines populations à risque comme les immunodéprimés ou les fœtus (Robert-Gangneux et Dardé, 2012). En revanche, l'Amérique du Sud est un foyer de toxoplasmoses oculaires (Pfaff et al., 2014), voire, de façon exceptionnelle dans certaines régions d'Amazonie, de toxoplasmoses potentiellement mortelles chez des personnes immunocompétentes (Carme et al., 2009; Demar et al., 2007). Ces formes graves semblent directement en lien avec la virulence des souches qui circulent dans cette région du globe. De plus en plus d'études pointent du doigt le rôle de la diversité génétique du parasite dans la pathogénicité de *T. gondii* (Dardé, 2008) et il semblerait que les zones tropicales soient plus propices à des formes sévères.

Toutefois, la diversité mondiale est loin d'être connue, tant de pays restant inexplorés. De plus, cette diversité ne serait pas figée et serait influencée par des échanges de souches au travers de la circulation de leurs hôtes à plus ou moins grande échelle. La mondialisation a d'ailleurs déjà permis l'introduction de certains pathogènes sur de nouveaux territoires (Yalcindag et al., 2012; Harrison, 2012), créant ainsi des problèmes de santé publique inédits pour ces pays. Récemment en France, des cas de toxoplasmoses humaines sévères ont été recensés suite à l'importation de viandes de cheval sud-américaines contaminées par des souches virulentes (Pomares et al., 2011). Ceci montre que des souches de toxoplasme peuvent voyager d'un continent à l'autre, mais sans la possibilité de s'y implanter de façon pérenne dans l'environnement, représentant alors seulement un évènement isolé. Cet évènement est-il réellement isolé ou n'y a-t-il pas eu d'autres évènements par le passé ayant profondément changé la structure des populations du toxoplasme dans le monde? Il est même probable que cette structure mondiale observée en 2020 puisse changer dans 20 ans en raison de l'amplification des échanges, l'ouverture de certains pays à la mondialisation mais également en raison des changements climatiques accélérés depuis quelques décennies.

A l'occasion de cette thèse, nous nous sommes intéressés à la diversité génétique de *T. gondii* en Afrique, en comparaison à l'Europe et l'Amérique du Sud dans le cadre du projet ANR Introtax. Ces trois continents ont une histoire commune d'échanges intenses lors de la période coloniale (Richardson et Eltis, 2015) et nous supposons qu'ils auraient été accompagnés d'introduction de pathogènes. De précédentes études ont déjà montré le rôle du commerce maritime au Sénégal sur l'introduction du rat noir et de la souris domestique (proies privilégiées de l'hôte définitif du parasite, les félidés) pendant cette période (Lippens et al., 2017) et l'impact que cela a eu sur les populations de *T. gondii* dans ce pays (Galal et al., 2019a). Nous avons donc réalisé une campagne d'échantillonnage au Bénin, ancienne colonie portugaise puis française, deuxième pays africain exportateur d'esclaves après l'Angola, et dont la ville côtière de Ouidah est tristement connue pour son marché d'esclaves africains avec près d'un million de captifs envoyés vers le Nouveau Monde par les Européens (Richardson et Eltis, 2015).

Lors du travail de terrain au Bénin, nous avons isolé des souches de *T. gondii* à partir d'animaux domestiques (en l'occurrence des volailles, bons bioindicateurs de la circulation de souches dans l'environnement) mais aussi de rongeurs. Grâce à des analyses de génétique des populations sur ces souches et à des analyses de génomes, nous avons pu envisager et discuter en partie de l'histoire évolutive du parasite et la manière dont celle-ci a influencé la structure des populations actuelles dans cette partie de l'Afrique mais aussi sur d'autres continents ayant participé au commerce triangulaire.



Figure 1 : Vente de volailles et chatons à Cotonou

Source : photo personnelle

Chapitre I. Contexte bibliographique et objectifs de la thèse

I.1. Généralités sur le parasite *Toxoplasma gondii*

I.1.1. La découverte du toxoplasme



Figure 2 : *Ctenodactylus gundi*

Source : https://en.wikipedia.org/wiki/Common_gundi

En 1908, Charles Nicolle et Louis Manceaux, chercheurs à l'Institut Pasteur de Tunis, étudient les réservoirs environnementaux de la leishmaniose lorsqu'ils isolent ce qui semble être un nouveau parasite lors de prélèvements sur *Ctenodactylus gundi*, un rongeur autochtone de l'actuelle Tunisie (Figure 2). Ce parasite morphologiquement proche d'amastigotes de leishmanie mais avec des propriétés biologiques différentes : plus allongé, sans centrosome et ne pouvant pas se multiplier dans des milieux de culture spécifiques aux leishmanies (Nicolle et Manceaux, 1908; Dubey, 2008). Cela a amené à proposer un nouveau genre, *Toxoplasma* (du grec toxon pour arc pour sa morphologie) et son nom d'espèce, *gondii*, a été donné en hommage à son hôte d'isolement initial. La même année, le caractère international du parasite est confirmé par l'isolement de *T. gondii* chez un lapin de laboratoire par Alfonso Splendore à São Paulo au Brésil (Splendore, 1908) (Figure 3).



Figure 3 : Alfonso Splendore (à gauche) et Charles Nicolle (à droite)

Source : <https://www.academiamedicinasapaulo.org.br/biografias/11/BIOGRAFIA-ALFONSO-SPLENDRE.pdf> ; <https://www.pasteur.fr/fr/institut-pasteur/charles-nicolle-prix-nobel-1928>

I.1.2. Cycle de transmission

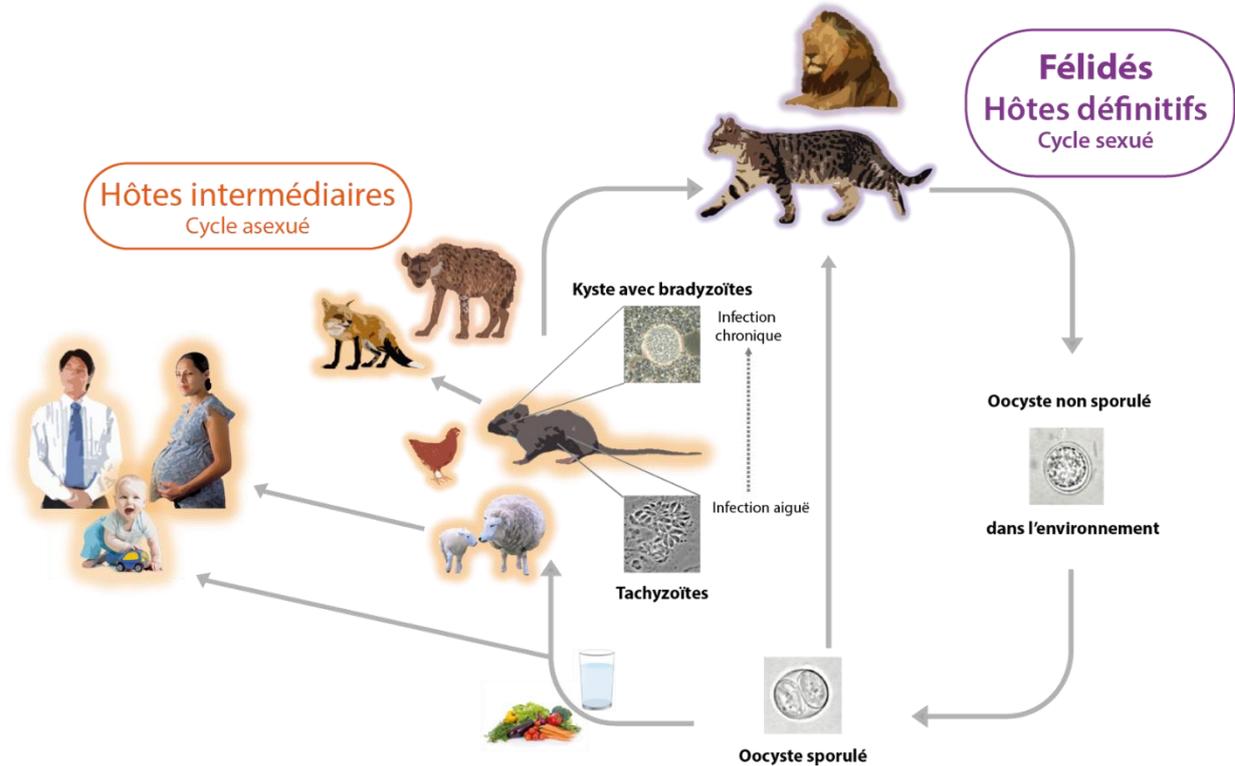


Figure 4 : Cycle de vie et transmission du toxoplasme

Source : illustration personnelle

Le parasite *Toxoplasma gondii* peut infecter une multitude d'hôtes homéothermes mais certains d'entre eux ont un rôle particulier dans sa transmission. Chez les *Apicomplexa* comme *T. gondii*, le cycle est composé d'une reproduction sexuée et asexuée (Figure 4). Les félidés sont leurs seuls hôtes définitifs : la reproduction sexuée du parasite n'est possible que chez eux. Lors d'une primo-infection d'un féliné après ingestion d'une proie infectée, les toxoplasmes se multiplient dans ses entérocytes, puis se différencient en gamétocytes mâles ou femelles amenant à la formation d'oocystes que le féliné excrètera dans l'environnement par millions via ses fèces (Dubey, 1995). Les oocystes, initialement non sporulés (i.e. non infectieux) vont sporuler et devenir infectieux, pouvant ainsi contaminer de nouveaux hôtes et restent viables plusieurs mois dans des conditions climatiques propices. Dans la majorité des cas, les félidés ne sont capables de disséminer *T. gondii* qu'uniquement après cette primo-infection et pendant une période allant de sept à quinze jours car une immunité empêchant la réinfection sera mise en place.

En opposition aux hôtes définitifs, chez les hôtes intermédiaires, seule une reproduction asexuée est possible. Les parasites se différencient en tachyzoïtes dans les cellules épithéliales de leur intestin. Ils représentent la forme circulante du parasite, avec une multiplication rapide dans les cellules de la sous-muqueuse intestinale avant de passer dans

la circulation lymphatique et sanguine, pouvant ainsi migrer vers tous les autres organes du corps. Cette faculté est particulièrement problématique lorsque l'infection se produit au cours de la gestation avec les risques de transmission congénitale, les tachyzoïtes pouvant traverser la barrière placentaire, d'autant plus facilement avec l'avancée de la grossesse qui rend cette barrière plus perméable. Mais au bout de quelques jours, une réponse immunitaire de l'hôte à l'infection par les parasites les amènera à se différencier en bradyzoïtes enfermés dans des kystes intracellulaires pour échapper au système immunitaire. C'est ainsi que la phase chronique de l'infection débute et persiste théoriquement tout au long de la vie de l'hôte. A noter qu'une réinfection est possible dans des cas exceptionnels, souvent en lien avec des génotypes très différents de celui de la primo-infection (Dao et al., 2001; Elbez-Rubinstein et al., 2009).

Les sources d'infection sont donc en lien avec le stade parasitaire. Une infection par oocystes représente une infection environnementale, avec consommation de végétaux ou d'eau contaminée par les fèces des félins : c'est la source d'infection première pour les herbivores. En revanche, la consommation de tissus contenant des kystes de *T. gondii* est principalement la source d'infection des carnivores ou charognards. Un jeune félin non immunisé pourra donc redémarrer un cycle de dissémination de cette manière. Des espèces omnivores comme l'humain peuvent s'infecter des deux façons. Pour éviter l'infection, il faut également prendre en compte le stade parasitaire. En effet, dans le cas des oocystes, la prévention repose sur le lavage des mains et des aliments, et l'eau contaminée bouillie ou filtrée. Dans le cas des kystes, une cuisson à cœur des viandes infectées à plus de 60°C permet de tuer le parasite (El-Nawawi et al., 2008).

I.1.3. La toxoplasmose

I.1.3.1. La toxoplasmose animale

La toxoplasmose est une maladie zoonotique, elle infecte donc autant l'humain que l'animal. Ici encore, l'infection est généralement asymptomatique comme par exemple chez les animaux de rente ou les chats (Dubey, 2010). Mais elle est bien connue comme source d'avortements chez les ovins lors de la primo-infection (Dubey et Welcome, 1988; Dubey, 2009). Il est crucial de prévenir ces infections à cause de l'importance de la perte économique engendrée.

La relation hôte/pathogène est un facteur déterminant dans la virulence du parasite. Chez certaines espèces, il peut être particulièrement virulent même lorsqu'il s'agit de souches classées comme non virulentes (e.g. Type II) selon les études expérimentales sur souris de laboratoire. Par exemple, une forte mortalité a été observée chez les singes du Nouveau-Monde (Dietz et al., 1997; Epiphanio et al., 2000; Epiphanio et al., 2003), des lagomorphes

(Dubey et al., 1992; Sedlák et al., 2000; Jokelainen et al., 2011), ou des chats de Pallas en zoo avec des souches de Type II considérées comme avirulentes chez la souris de laboratoire souris (souris Swiss) (Dubey et al., 1988; Basso et al., 2005; Brown et al., 2005). Mais les connaissances restent maigres concernant la faune sauvage.

I.1.3.2. Données générales sur la toxoplasmose humaine : épidémiologie et aspects cliniques

Le toxoplasme infecterait près d'un tiers de la population humaine mondiale. La prévalence de l'infection dans le monde est disparate avec par exemple plus de 60% au Brésil contre moins de 10% en Angleterre en 2009 (Pappas et al., 2009) et la plupart des études en population humaine se font sur les femmes enceintes, de par le risque que présente le parasite pour le fœtus. En France, en 2010, 36,7% de femmes enceintes étaient séropositives pour l'infection toxoplasmique (Tourdjman et al., 2015), 31% en 2016 (rapport CNR 2019).

Environ 80% de la population infectée le sont de façon asymptomatique (Halonen et Weiss, 2013). Dans les quelques 20% restants, l'infection est souvent bénigne avec des symptômes non spécifiques chez l'immunocompétent comme de la fièvre, une asthénie ou une lymphadénopathie (Taila et al., 2011), plus rarement des atteintes oculaires et de façon exceptionnelle des formes mortelles. Cependant, la toxoplasmose peut s'exprimer à travers une forme grave dans un contexte d'immunosuppression (e.g. infection par le VIH ou traitement par un immunosuppresseur) ou lors d'une primo-infection pendant la grossesse. Selon le moment de l'infection pendant la grossesse, les conséquences cliniques sont différentes (Berthélémy, 2014). On décrit ainsi dans un contexte européen :

- Après une infection du premier trimestre (transmission rare) : avortement, mort fœtale, séquelles neurologiques et oculaires sévères (dilatations ventriculaires, hydrocéphalie etc.).
- Après une infection du deuxième trimestre : séquelles neurologiques et oculaires (hydrocéphalie, calcifications intracérébrales, rétinoblastome).
- Après une infection du troisième trimestre (la plus fréquente) : forme latente à la naissance dans 80% des cas mais avec un risque latent de rétinoblastome.

Mais le parasite peut également être dangereux pour d'autres populations, non immunodéprimées. Dans certaines régions du monde, comme l'Amérique du Sud, une plus forte prévalence de toxoplasmoses oculaires est observée (Petersen et al., 2012; Furtado et al., 2013). C'est également en zone amazonienne que de graves formes pulmonaires et disséminées sont le plus retrouvées, probablement en lien avec la génétique de *T. gondii*.

I.1.4. La diversité génétique du toxoplasme dans le monde

I.1.4.1. Les outils d'analyse et leur évolution

Dans les années 1980, les scientifiques ont commencé à s'intéresser à la diversité génétique du toxoplasme, avec comme hypothèse un rôle de cette diversité dans la variabilité des signes cliniques observés. Les premières études ont été basées sur des données phénotypiques, les souches étant isolées lors d'infections expérimentales sur des animaux de laboratoires. Par exemple, des différences ont été notées chez la souris de laboratoire, où certaines souches s'avèrent virulentes voire létales tandis que d'autres non (Mercier et al., 2010; Galal et al., 2019a). C'est ainsi que les génotypes archétypaux Type I (virulent), Type II (avirulent) et Type III (virulent à forte dose) ont été décrits, sur la base d'échantillonnages en Occident. Par la suite, plusieurs marqueurs ont été utilisés pour évaluer la diversité génétique de *T. gondii* et la caractériser.

Le typage isoenzymatique (Dardé et al., 1988; Dardé et al., 1992) et le génotypage par quelques marqueurs PCR-RFLP (Cristina al., 1991a; Cristina et al., 1991b; Sibley et al., 1992; Howe et Sibley, 1995) ont été les premiers outils dans les années 1980-1990 à permettre la classification des isolats de *T. gondii* en différents groupes. Ils ont également montré le lien entre le génotype et la virulence d'une souche. A cette époque, seules trois lignées clonales ont été décrites : les types I, II et III. Ceci a conduit certains auteurs à proposer un génotypage basé sur un seul locus du génome aboutissant à une sous-estimation de la réelle diversité génétique. Ce n'est qu'après la mise au point de nouveaux marqueurs moléculaires multilocus, les SNPs pour "Single Nucleotide Polymorphism" (Khan et al., 2005; Su et al., 2006) et les microsatellites (Ajzenberg et al., 2010), associée à une plus grande diversité géographique des isolats analysés originaires d'espèces hôtes plus diversifiées, qu'une plus fine résolution a été obtenue. Ceci a permis de décrire la réelle complexité de la diversité génétique de *T. gondii* et l'attribution d'origine géographique de certaines lignées. En effet, l'analyse multilocus est plus représentative du génome et permet l'éventuelle détection de recombinaisons alléliques. De nos jours, ces marqueurs RFLP sont toujours utilisés.

L'étude des SNPs peut se faire par séquençage de gènes ou par PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Dardé et al., 2020). C'est cette dernière technique qui est la plus utilisée dans le monde car peu coûteuse. Elle consiste en l'observation ou non d'un site de restriction après des mutations ponctuelles du génome. Cependant, cette technique est peu discriminante et ne permet pas de différencier des souches proches génétiquement. Basée sur l'utilisation d'endonucléases qui coupent le produit de PCR au niveau des SNPs et la révélation par électrophorèse sur gel d'agarose, il s'agit donc d'une méthode de polymorphisme de longueur des fragments de restriction des gènes amplifiés. Cette technique

a évolué depuis les années 1990 pour aujourd'hui utiliser dix marqueurs au total, neuf premiers (*SAG1*, *SAG2*, *SAG3*, *BTUB*, *GRA6*, *c22-8*, *c29-2*, *L358* et *PK1*) répartis sur huit chromosomes et un marqueur apicoplastique (*Apico*) (Su et al., 2006; Su et al., 2010). La classification résultant de ces analyses a permis la création de la banque de données *ToxoDB* (www.toxodb.org/), permettant l'attribution d'un code à chaque génotype.

La méthode utilisant les marqueurs microsatellites (MS) quant à elle permet d'augmenter la résolution et de mieux distinguer deux souches proches. Ces marqueurs sont des fragments courts d'ADN répétés en tandem. Il s'agit encore une fois d'étudier le polymorphisme de taille des MS en observant la variabilité du nombre de répétitions du motif MS. Initialement basée sur cinq puis huit marqueurs (Ajzenberg et al., 2002; Ajzenberg et al., 2005), cette technique utilise aujourd'hui 15 marqueurs (*TUB2*, *W35*, *TgM-A*, *B18*, *B17*, *M33*, *IV.1*, *XI.1*, *M48*, *M102*, *N60*, *N82*, *AA*, *N61*, *N83*) répartis sur 11 chromosomes différents (Ajzenberg et al., 2010) et qui sont amplifiés en une seule PCR multiplex. Deux niveaux de discrimination sont possibles. Les huit premiers marqueurs (*TUB2* à *XI.1*), marqueurs de typage, permettent de repérer l'appartenance de la souche à un groupe génétique défini (types, lignées clonales ou regroupement géographique). En dehors des cas où les souches tombent dans les catégories déjà bien connues des Types I, II et III ou encore des souches n'appartenant à aucune des lignées clonales déjà découvertes (elles seront alors désignées comme génotype unique ou atypique), les souches sont généralement nommées avec cette technique en référence à leur origine géographique (par exemple Caribbean 1 ou Africa 1). Les sept marqueurs suivants (*M48* à *N83*) sont hautement polymorphes et permettent de distinguer les souches entre elles au sein d'une même lignée.

Ces deux méthodes sont utilisées en routine et des équivalences entre les génotypes PCR-RFLP et MS ont été établies (Galal et al., 2019b) (Tableau 1). Cependant, bien qu'encore coûteuses, les analyses basées sur le séquençage de gènes multilocus ou sur le génome complet (WGS pour Whole Genome Sequencing) représentent l'avenir de la biologie moléculaire pour l'étude de la diversité génétique de *T. gondii*. Ces techniques ont déjà été utilisées à certaines occasions pour l'étude de l'origine des lignées actuelles du parasite (Khan et al., 2007; Bertranpetit et al., 2017) et de la structure globale de ses populations (Su et al., 2012; Lorenzi et al., 2016). A ce jour, 16 haplogroupes ont été décrits répartis en 6 clades (Figure 5).

Tableau 1 : Correspondance de génotypes de *Toxoplasma gondii* en fonction de différentes techniques (Séquençage de génomes complets, MLST, PCR-RFLP et 15 MS) et leur origine géographique (adapté de Galal et al., 2019b)

Clades et haplogroupes définis par séquençage de génome complet (Lorenzi et al., 2016)	Haplogroupes définis par MLST (Su et al., 2012)	ToxoDB PCR-RFLP Génotype # (www.toxodb.org; Su et al., 2012)	Groupes définis par 15 MS (Ajzenberg et al., 2010)	Origine géographique
A1	/	91	Atypique	Amérique du Sud
		38	/	Amérique du Sud
		10	Type I	Asie, Amérique du Sud
	1	17	Atypique	Amérique du Sud
/		27; 35; 55	Atypique	Amérique Centrale; Amérique du Sud
D2	/	139	III/II	Amérique du Nord
		127	II/III	Amérique du Nord
	2	1; 3	Type II	Europe; Amérique du Nord, Afrique du Nord
/		128	II	Amérique du Sud
		129	Atypique	Amérique du Sud
C3	/	2	Type III	Mondial
		73*	Atypique	Amérique du Nord
		12	Caribbean 2	Amérique du Sud, Caraïbes
		133	Type III	Amérique du Nord
		72	Type III	Amérique du Nord
/	3	2; 7	II; III	Amérique du Nord; Amérique Centrale
		13	Caribbean 1	Caraïbes
		25*	Caribbean 3	Amérique du Sud
		26	Atypique	Amérique du Sud
		31	Caribbean 2	Amérique du Sud
		50	Type III	Amérique Centrale
		79	Atypique	Amérique du Sud
		83	III variant	Caraïbes
		90	Atypique	Amérique du Nord
		115; 118; 125; 130	Atypique	Amérique du Nord; Caraïbes; Amérique du Sud
		140	Type III	Amérique Centrale
		141	Caribbean 3	Caraïbes
		B4		11
		17	Atypique	Amérique du Sud
B8		119; 104	Atypique	Amérique du Sud
	4	47	Atypique	Amérique du Sud
/		17	Atypique	Amérique du Sud
		76; 92; 93; 99; 107; 108; 124; 126	Atypique	Amérique du Sud; Afrique
		106	/	Amérique du Sud
A15		52	Atypique	Amérique Centrale
F5	5	60; 95; 98; 193	Amazonian	Amérique du Sud
/		22; 37; 65; 100	Atypique	Amérique du Sud
A6	6	6	Africa 1	Afrique
		80; 42; 85	Atypique	Amérique du Sud

/		33; 41; 51; 56; 70; 82; 84; 105	Atypique	Amérique du Sud
		17	/	Amérique du Sud
		86	Africa 1	Amérique du Sud
A7	7	77	Atypique	Amérique du Sud
B8		28	Atypique	Amérique du Nord
		19	Atypique	Amérique du Sud
/	8	32; 40; 59; 64; 69; 71; 75; 121	Atypique	South America; North America
		53	Atypique	Amérique du Sud
		94	Atypique	Amérique du Sud
B8		21	Atypique	Amérique du Sud
C9		8	Atypique	Amérique du Nord
		14	Atypique	Amérique du Sud
/	9	45; 46; 67; 114; 116; 120; 138	Atypique	Amérique du Sud
		78	Caribbean 1	Amérique du Sud
		123	III/II	Amérique du Sud
F10		60; 97; 194	Amazonian	Amérique du Sud
/	10	96	Atypique	Amérique du Sud
B4		34	Caribbean 1	Amérique du Sud
D12		4; 5	HG12	Amérique du Nord
/	12	39	HG12	Amérique du Nord
		49	Atypique	Caraiïbes
		74	II/III or variant B18	Amérique du Nord
D13		9*	Chinese 1	Asie
/	13	137	Africa 4	Afrique
A14		203	Africa 3	Afrique
/	14	36; 88	Atypique	Amérique du Sud
A15		61	Atypique	Amérique du Sud
/		63	Atypique	Amérique du Sud
B8		111	Atypique	Amérique du Sud
/	15	134	III variant TUB2	Amérique du Sud
		23; 44; 63; 81; 101; 109; 135	Atypique	Amérique Centrale; Amérique du Sud
		136	/	Amérique du Sud
D11	11*	197	Atypical Guiana	Amérique du Sud
A15	/	66	Atypique	Amérique du Nord
/	/	43	/	Amérique Centrale
/	/	20	Africa 4	Afrique; Asie
/	/	54	III	Amérique du Nord
/	/	112	/	Caraiïbes
/	/	29	/	Amérique du Sud
/	/	132	/	Afrique
/	/	16	/	Amérique Centrale
/	/	102	/	Amérique Centrale
/	/	62	/	Amérique du Sud
/	/	57*	/	Amérique du Sud
/	/	30*	/	Amérique du Sud
/	/	48*	/	Amérique du Sud
/	/	122*	/	Amérique du Sud
/	/	131*	/	Amérique du Nord
E16	16*	15; 17; 202	HG16	Amérique du Sud, France (humain)

/; haplogroupe non défini

*; le regroupement ne correspond pas entre les analyses Network et Structure (Su et al., 2012)

En gras et souligné: informations correspondantes quelles que soient les méthodes de génotypage

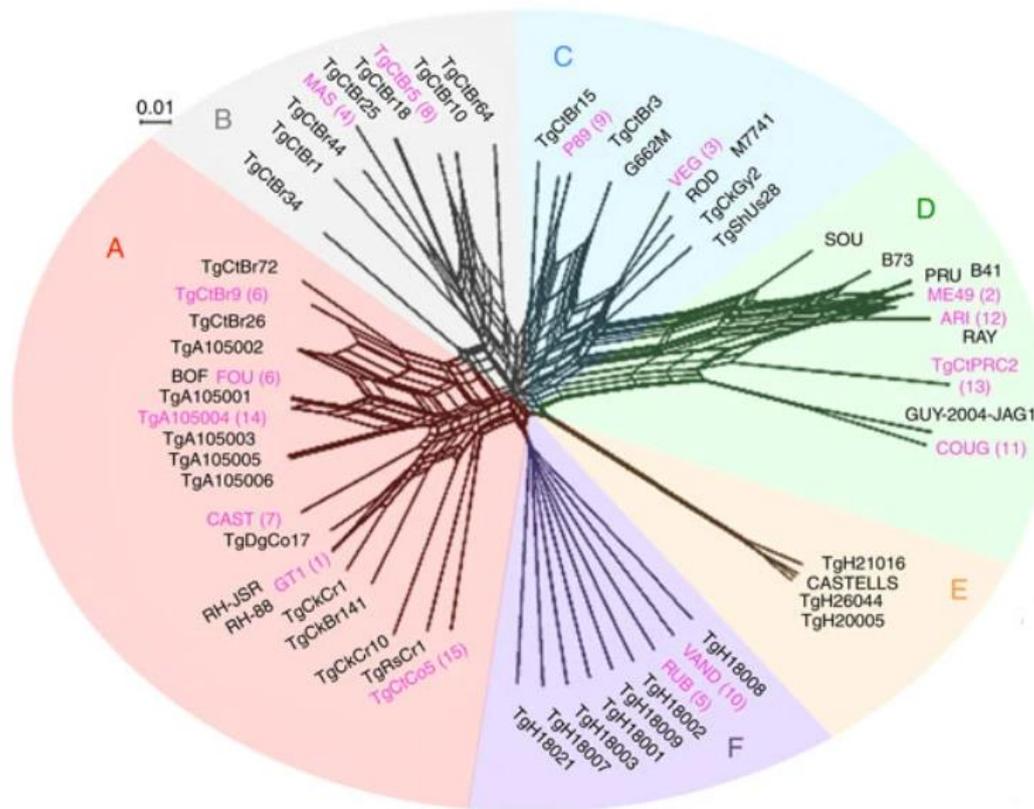


Figure 5 : Arbre de Neighbor-Joining réalisé à partir de 62 génomes de *T. gondii*

Source : Lorenzi et al., 2016

I.1.4.2. Tour du monde de la diversité génétique

Les premiers travaux s'intéressant à la diversité génétique du toxoplasme ont très largement sous-estimé sa réelle diversité, de par les techniques moléculaires utilisées et l'origine des isolats (diversité géographique et d'hôtes). Les premiers isolats provenaient essentiellement d'humains ou d'animaux domestiques de l'hémisphère Nord (Europe et Amérique du Nord) amenant à la première classification en Types I, II et III. Encore aujourd'hui, un important biais d'échantillonnage est présent. La majorité des études privilégie l'isolement à partir d'animaux domestiques et des zones restent inexplorables pour diverses raisons (isolement géographique, infrastructure non adaptée, conflit armé etc.). Malgré la possibilité de faire un typage direct, la sensibilité est moindre et la souche est perdue une fois l'ADN isolé. La lourdeur du protocole d'isolement, demandant une logistique de terrain et administrative considérable, y est pour beaucoup dans le manque de souches sauvages. En effet, le toxoplasme est un parasite intracellulaire obligatoire et il faut donc pour l'isoler avoir accès à des tissus frais d'animaux infectés qu'il faut rapidement traiter et inoculer à la souris de laboratoire. Ceci expliquerait la rareté des souches provenant de la faune sauvage ou de

zones inaccessibles, bien que certains continents comme l'Amérique du Sud aient été bien échantillonnés sur le volet humain, animal domestique et sauvage en raison de la gravité des formes cliniques sur place (Glasner et al., 1992; Demar et al., 2007; Carme et al., 2009; Cañón-Franco et al., 2014). Un récent travail de stage de Master 1 (Sonia Ibrahim Ouali) a permis de cartographier les génotypes de *T. gondii* à partir de 2692 données microsatellites issues d'une base de données de l'UMR 1094 NET et du CNR de la Toxoplasmose Pôle Souches (Figure 6).

De manière globale, ce qui avait été observé précédemment par (Shwab et al., 2014) avec 189 données PCR-RFLP humaines se retrouve ici : une prédominance des Types II et III dans l'hémisphère Nord et un hotspot de diversité en Amérique du Sud et plus particulièrement au Brésil. Mais ce stage de master vient rectifier un biais de la carte de Schwab et collaborateurs en ajoutant des génotypes animaux, plus représentatifs de la réelle diversité autochtone, et en reclassant les cas de toxoplasmoses humaines importées dans les pays d'origine de l'infection plutôt que le pays où le parasite a été isolé.

Bien que la représentation semble de plus en plus complète, de nombreuses zones restent encore inexplorées. Un échantillonnage plus important et de nouvelles techniques de génotypage permettraient à l'avenir d'avoir des résultats plus fiables.

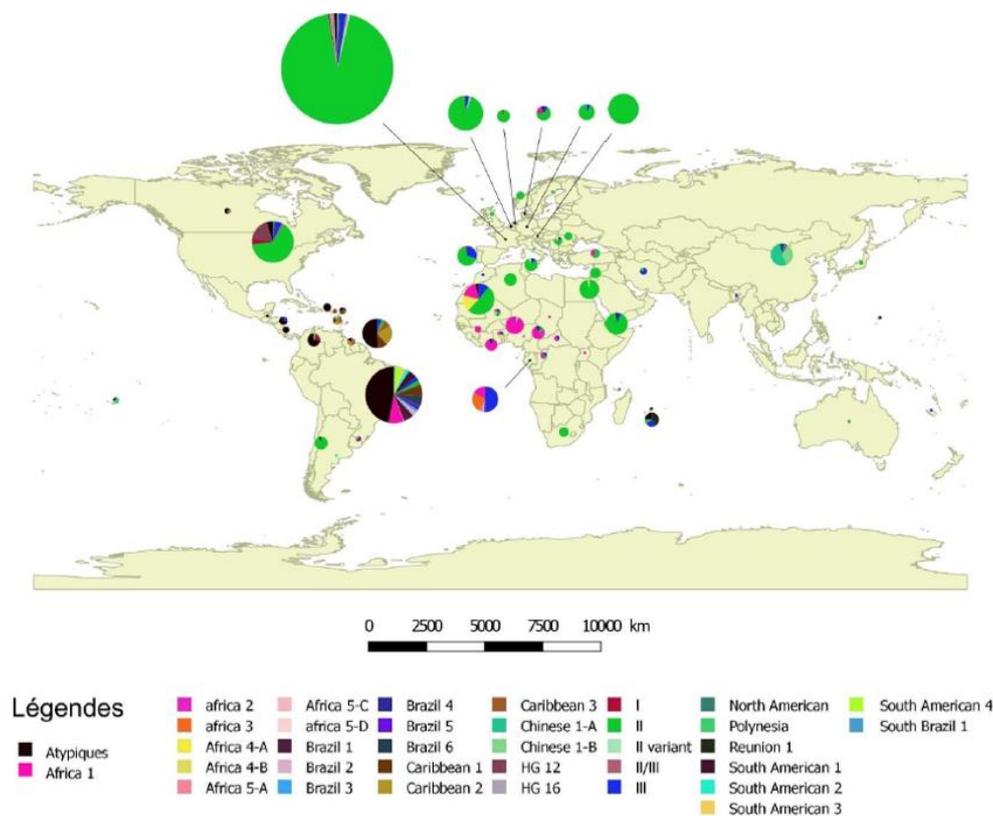


Figure 6 : Répartition géographique des génotypes 15 MS de *Toxoplasma gondii*

Source : Ibrahim Ouali, rapport de master 1, 2020

I.2. Focus sur l'Afrique

I.2.1. Epidémiologie et formes cliniques

En Afrique, la toxoplasmose reste encore peu étudiée. Face à d'autres infections estimées plus prioritaires comme le paludisme, le SIDA, la tuberculose ou plus récemment Ebola, des études sur une infection qui semble asymptomatique dans la majorité des cas ne paraît pas être une priorité en santé publique. Mais le nombre de cas de toxoplasmoses chez des personnes sidéennes attirent l'attention sur une situation qui est loin d'être anodine, faisant de la toxoplasmose une des principales causes de mortalité chez ces personnes avec la tuberculose, la cryptococcose et les chocs septiques (Lewden et al., 2014). De plus, plusieurs cas de toxoplasmose disséminée (plusieurs organes touchés) et de toxoplasmose oculaire ont été rapportés par le CNR Toxoplasmose chez des immunocompétents (Rapport CNR 2019; Leroy et al., 2019).

I.2.1.1. Le problème de la toxoplasmose oculaire en Afrique

Le parasite *T. gondii* est l'une des principales causes d'uvéïtes et rétinites dans le monde (Amin et al., 2019; Abu et al., 2016), l'œil étant l'un des organes-cibles lors de manifestations symptomatiques de l'infection (Figure 7). L'origine congénitale est souvent responsable de ces problèmes oculaires, mais de plus en plus d'études montrent qu'elle peut être acquise chez des personnes immunocompétentes (Runday et al., 1995; Ross et al., 2001; Balasundaram et al., 2010).

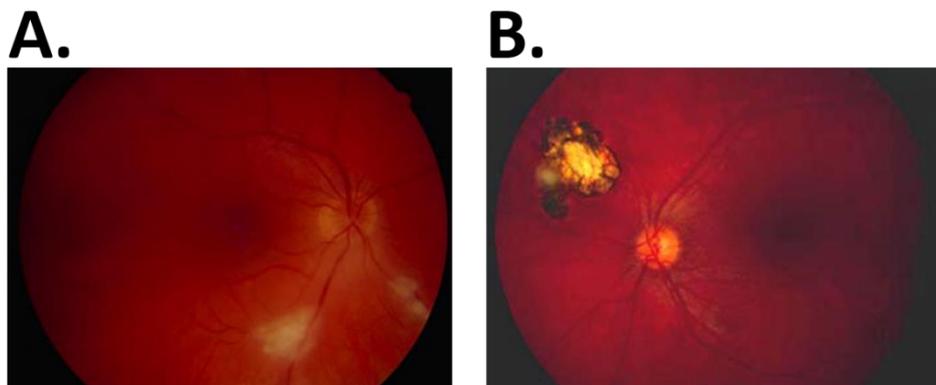


Figure 7 : **A.** Lésion toxoplasmique récente **B.** Lésion toxoplasmique cicatricielle

Source : Pr André Mathis CHU Toulouse-Rangueil France

(<https://www.snof.org/encyclopedie/toxoplasmose-oculaire>)

Dans le cas d'une infection congénitale (une à 10 naissances sur 10000), environ 175 à 300 enfants touchés auront des séquelles oculaires (i.e. rétinohoroidite) dans leurs deux premières années de vie (Sauer et al., 2013). Lors d'une toxoplasmose acquise, les premiers signes oculaires peuvent apparaître jusqu'à 5 ans après infection.

En Europe et en Amérique du Nord, les prévalences de TO (toxoplasmose oculaire) sont de 2%, alors qu'en Amérique du Sud, continent où il y a le plus de cas de toxoplasmoses sévères, la prévalence grimpe à 18% (Nsiangani-Lusambo et al., 2019). En Afrique, les données de prévalence sont inexistantes, mais nous savons que des patients présentant une uvéite ont entre 29 et 58% de « chances » que cela soit dû à *T. gondii* (Nsiangani-Lusambo et al., 2019). Sur ce continent, le toxoplasme est d'ailleurs régulièrement dans le Top 3 des causes de séquelles oculaires, avec le cytomégalovirus (Aki et al., 2019) ou la syphilis (Rautenbach et al., 2019). En République Démocratique du Congo (RDC) et en Egypte, il a même été décrit comme la cause principale des uvéites postérieures (Amin et al., 2019): 25% des uvéites en RDC étaient dues à la toxoplasmose et parmi ces cas, 74% avaient des lésions chorioretiniennes. Selon la position de ces lésions, le pronostic visuel n'est pas toujours perturbé, mais une déficience visuelle est observée dans 70% des cas (Abu et al., 2016; Nsiangani-Lusambo et al., 2019). Mais ces séquelles sont-elles d'origine congénitale ou acquise ? Plusieurs études sub-sahariennes en Sierra Leone (Ronday et al., 1995), Ghana (Abu et al., 2016) et RDC (Nsiangani-Lusambo et al., 2019) suggèrent une prédominance de cas d'origine acquise, en raison d'une atteinte majoritairement unilatérale pour 61 à 90% des cas.

Pour finir de démontrer le problème de la toxoplasmose oculaire africaine, il a été observé à Londres une incidence de rétinocoroïdite toxoplasmique 100 fois plus élevée pour les patients nés en Afrique de l'Ouest comparé à des patients nés en Angleterre (bien que la méthodologie de l'étude soit discutable) (Gilbert et al., 1995).

I.2.1.2. Les cas africains de toxoplasmose sévère

La toxoplasmose sévère est généralement caractérisée par une forte fièvre avec des atteintes viscérales secondaires diversifiées. Ce genre de diagnostic est compliqué à établir en Afrique, ces symptômes étant proches d'autres pathologies infectieuses.

Depuis quelques années, des cas de toxoplasmoses sévères chez des patients immunocompétents en Afrique ou en revenant sont rapportés alors que l'on pensait que ce genre de manifestation n'était observable qu'en Amérique du Sud. Au total, six cas ont été publiés (Beltrame et al., 2016; Gachet et al., 2018; Leroy et al., 2019). Dans l'étude de Leroy et collaborateurs de 2013 à 2018, quatre hommes, tous revenant d'Afrique de l'Ouest ou Centrale, ont présenté divers symptômes : deux avait une toxoplasmose disséminée (l'un avec une toxoplasmose oculaire et une myosite, l'autre avec une pneumopathie), un troisième patient avec une ataxie cérébelleuse aiguë post-infectieuse et le quatrième patient avec des symptômes généraux et des manifestations cutanées. En 2016, Beltrame et collaborateurs avaient eux aussi observé une toxoplasmose sévère après plusieurs crises épileptiques chez

un adolescent revenu d’Ethiopie (même si la relation entre les crises et la toxoplasmose aiguë reste à explorer). Enfin, Gachet et collaborateurs ont très récemment rapporté un cas de toxoplasmose chez un homme de 35 ans qui avait de la fièvre, des myalgies depuis un mois et une vision floue sur l’œil gauche. Les points communs entre ces patients : tous étaient immunocompétents et avaient voyagé en Afrique. Il semblerait que l’hypothèse soit la même qu’en Amérique du Sud, le génotype de la souche serait en majorité responsable de ces formes cliniques (notamment l’Africa 1).

I.2.2. La diversité génétique du toxoplasme en Afrique

La récente revue de la littérature de (Galal et al., 2018) a inclus 372 différents génotypes africains publiés sur les 15 dernières années avec une description de 27 lignées différentes (dont des atypiques) (Figure 8). Parmi les lignées archétypales, seuls les types II et III (avirulents pour la souris de laboratoire) ont été retrouvés en Afrique. Le Type II est prédominant en Afrique du Nord et de l’Est et semble plus marginal en Afrique de l’Ouest et Centrale. Le Type III semble être distribué de manière homogène, bien que les échantillons disponibles ne permettent pas d’en tirer d’autres conclusions.

Mais la diversité génétique de *T. gondii* ne s’arrête pas là car plusieurs lignées « non archétypales » ont été décrites : l’Africa 1 (appartenant à l’haplogroupe 6, HG 6), hautement virulent chez la souris de laboratoire, l’Africa 2 au Sénégal (un échantillon, mais également retrouvé par le CNR chez des patients du Cameroun), l’Africa 3 (appartenant à l’haplogroupe 14, HG 14), non virulent chez la souris de laboratoire et uniquement isolé au Gabon, et le nouvellement décrit Africa 4 (correspondant en PCR-RFLP à ToxoDB#20), non virulent chez la souris de laboratoire et encore très rare. Il y aurait donc à ce jour six lignées principales en Afrique (Type II, Type III, Africa 1, Africa 2, Africa 3 et Africa 4) mais dans cette revue, 23 souches étaient considérées comme génotype unique/atypique. Bien qu’elles ne se rattachent complètement à aucune lignée établie, la plupart d’entre elles se rapprochent des lignées africaines prédominantes. Mais le résultat important est l’opposition observée des structures des populations du toxoplasme entre l’Afrique du Nord et de l’Est et l’Afrique de l’Ouest et Centrale. Dans la première zone, il semble y avoir une concentration de génotypes archétypaux communs à l’Europe, alors qu’à l’Ouest, il s’agirait plutôt d’une diversité très autochtone. Ceci pourrait s’expliquer par des différences dans les événements historiques ou facteurs environnementaux des zones respectives. Par exemple, nous savons que les Types II et III auraient émergé avec l’agriculture il y a 10000 ans au niveau du croissant fertile en Moyen-Orient (Su et al., 2003). Le développement des routes commerciales trans-sahariennes (Austen, 2010) aurait contribué à la dispersion de ces génotypes en Afrique du Nord et de l’Est, au dépit des souches autochtones. En revanche, l’Afrique tropicale de l’Ouest et du

Centre est restée longtemps inaccessible, ce qui a permis la conservation de génotypes africains anciens jusqu'au développement du commerce colonial.

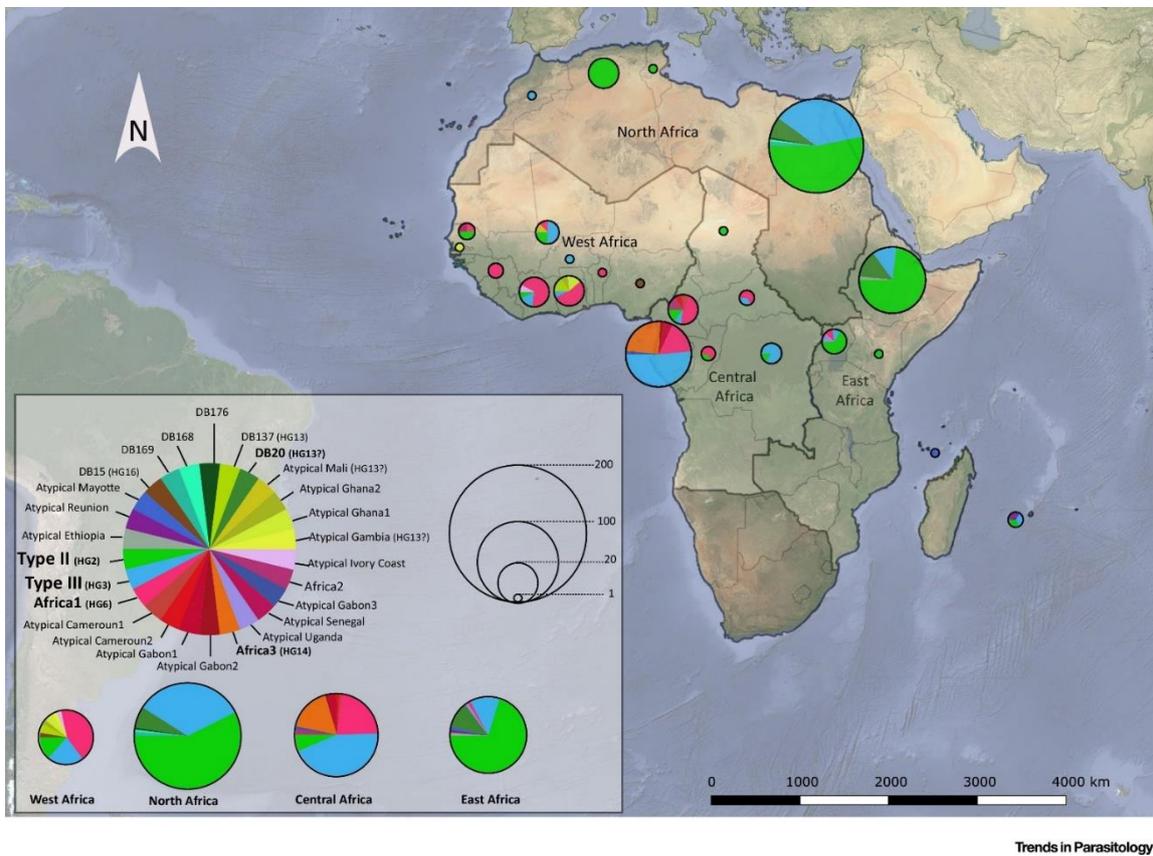


Figure 8 : Distribution géographique de souches de *Toxoplasma gondii* en Afrique

Source : Galal et al., 2017

I.2.3. Présentation du Bénin

I.2.3.1. Géographie

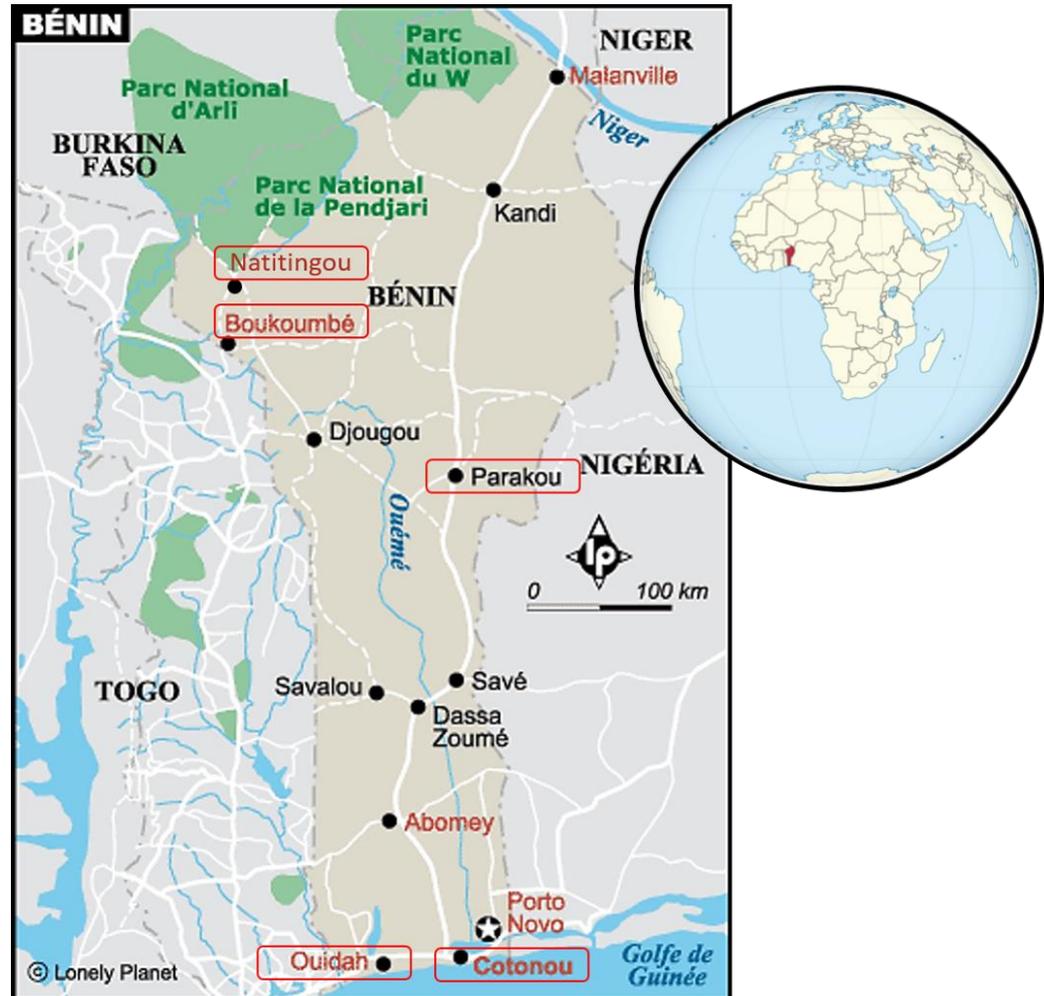


Figure 9 : Carte du Bénin avec les lieux d'échantillonnage lors du travail de terrain (encadrés)

Source : adapté de Lonely Planet et Wikimedia (<https://www.lonelyplanet.fr/carte/benin;>
[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Benin_on_the_globe_\(Africa_centered\).svg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Benin_on_the_globe_(Africa_centered).svg))

Situé en Afrique de l'Ouest sub-saharienne et délimité par le Togo à l'Ouest, le Nigéria à l'Est et le Niger et Burkina Faso au Nord, le Bénin est un pays en longueur d'une superficie de 114 763 km² (https://fr.wikipedia.org/wiki/Géographie_du_Bénin) (Figure 9). Au Sud, 121 km de côtes donnent sur l'Océan Atlantique et le Golfe de Guinée. Le relief est faible au Sud, tandis qu'il est plus accidenté dans le Nord du pays, notamment au niveau d'une chaîne montagneuse dans la région de Natitingou, l'Atakora. Environ 31% du pays est couvert de forêts, avec de vastes zones vierges, parfois sacrées (i.e. forêts sacrées d'Oro, de Kpassè ou encore de Savi), des mangroves sur la côte, mais aussi des savanes dans le Nord (parc national de la Pendjari).

La capitale du Bénin est Porto-Novo mais la majorité de l'activité économique est à Cotonou, la faisant capitale économique du pays. Les autres grandes villes sont Ouidah, tristement célèbre pour avoir été l'une des plus grandes plaques tournantes d'esclaves noirs d'Afrique de l'Ouest lors de la traite transatlantique avec sa « Route des esclaves », Parakou, ville carrefour sur l'axe routier et économique principal reliant le Sud au Nord du Bénin mais aussi pour aller vers le Niger et le Burkina Faso, et enfin Natitingou, ville perchée dans l'Atakora, proche du Parc National de la Pendjari, une réserve naturelle abritant de nombreuses espèces sauvages (Figure 10).

A.



B.



C.

D.

E.

Figure 10 : Photos de **A.** Cotonou, **B.** Lac Nokoué bordant Cotonou, **C.** Vestiges de la route des esclaves à Ouidah, **D.** Centre-ville de Parakou, **E.** Tata Somba (Habitations traditionnelles au Nord-Ouest du Bénin et Togo) sur la route de Boukoubé

Source : photos personnelles

Nous avons donc naturellement choisi ces villes et leurs alentours pour réaliser notre échantillonnage afin d'avoir un échantillonnage diversifié en termes d'environnement et une sorte de gradient d'urbanisation. En effet, Cotonou a été choisi pour son activité économique actuelle (port de commerce), Ouidah pour son histoire coloniale et échanges intercontinentaux passés importants, Parakou car plus à l'intérieur des terres mais tout de même sur un axe

roucier important et enfin Natitingou et Boukoumbé car difficiles d'accès à l'époque de notre terrain, rendant les échanges plus rares.

I.2.3.2. Situation géopolitique du Bénin

Le Bénin est un pays politiquement stable mais les régions frontalières sont déconseillées aux voyageurs par le gouvernement français (<https://www.diplomatie.gouv.fr/fr/conseils-aux-voyageurs/conseils-par-pays-destination/benin>). Dans le Nord, les zones proches du Burkina Faso et du Niger sont classées rouges (fortement déconseillées), hors elles abritent les parcs nationaux du W et de la Pendjari (Figure 11). En mai 2019, deux touristes français avaient été enlevés et leur guide tué par un groupe terroriste du Burkina Faso lors d'un safari dans le parc de la Pendjari. Ils ont été libérés avec deux autres otages une semaine plus tard après l'intervention des forces spéciales françaises qui aura coûté la vie à deux militaires.



Figure 11 : Zones de vigilance renforcée

Source : <https://www.diplomatie.gouv.fr/fr/conseils-aux-voyageurs/conseils-par-pays-destination/benin/#securite> (consulté le 8 septembre 2020)

En connaissance des dangers encourus, nous avons décidé de ne pas échantillonner à l'intérieur de ces zones.

I.2.3.3. Climat

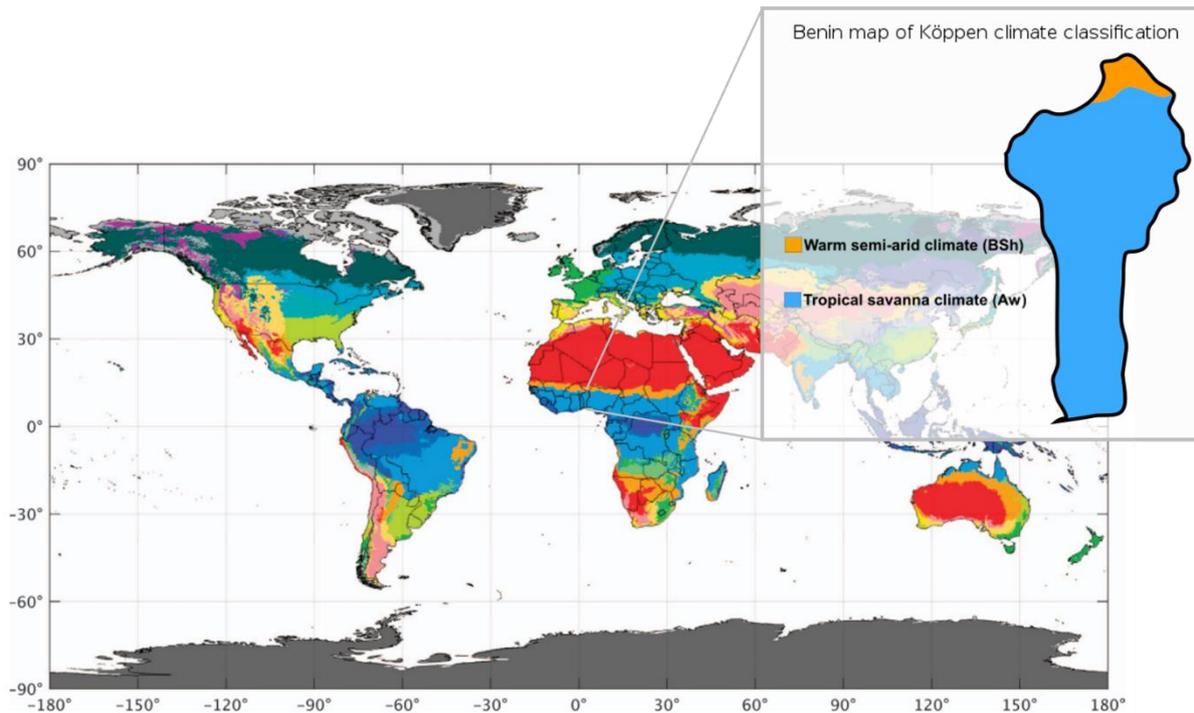


Figure 12 : Carte du climat béninois selon la classification de Köppen

Source : adapté de Beck et al., 2018 et Wikimedia

(https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Benin_map_of_K%C3%B6ppen_climate_classification.svg)

Le Bénin est caractérisé par un climat tropical sur la majorité du pays et un climat semi-aride dans le Nord proche du Sahel (Beck et al., 2018) (Figure 12).

Le climat béninois est qualifié en majorité par :

- Une température moyenne mensuelle supérieure à 18°C toute l'année
- Une grande saison sèche de novembre à mars et une petite saison sèche de juillet à août
- Des précipitations importantes pendant la saison des pluies d'avril à juin, et plus légères de septembre à octobre (jusqu'à 1300 mm/an)

Le Nord du pays, sous un climat sahélien, est caractérisé par des amplitudes thermiques marquées (températures d'environ 28°C en journée mais des nuits fraîches) et de faibles précipitations (environ 950 mm/an) (<https://capaustral.com/climat-meteo-benin.php>).

I.2.3.4. Population

Comparé à d'autres pays d'Afrique de l'Ouest et avec un recensement de 11 496 140 habitants en 2018, le Bénin est moins peuplé que ces voisins comme le Nigéria, le Burkina Faso ou le Niger (<https://www.populationdata.net/palmares/population>) mais il a une forte densité de population (100,17 hab./km²). La grande majorité de la population se concentre

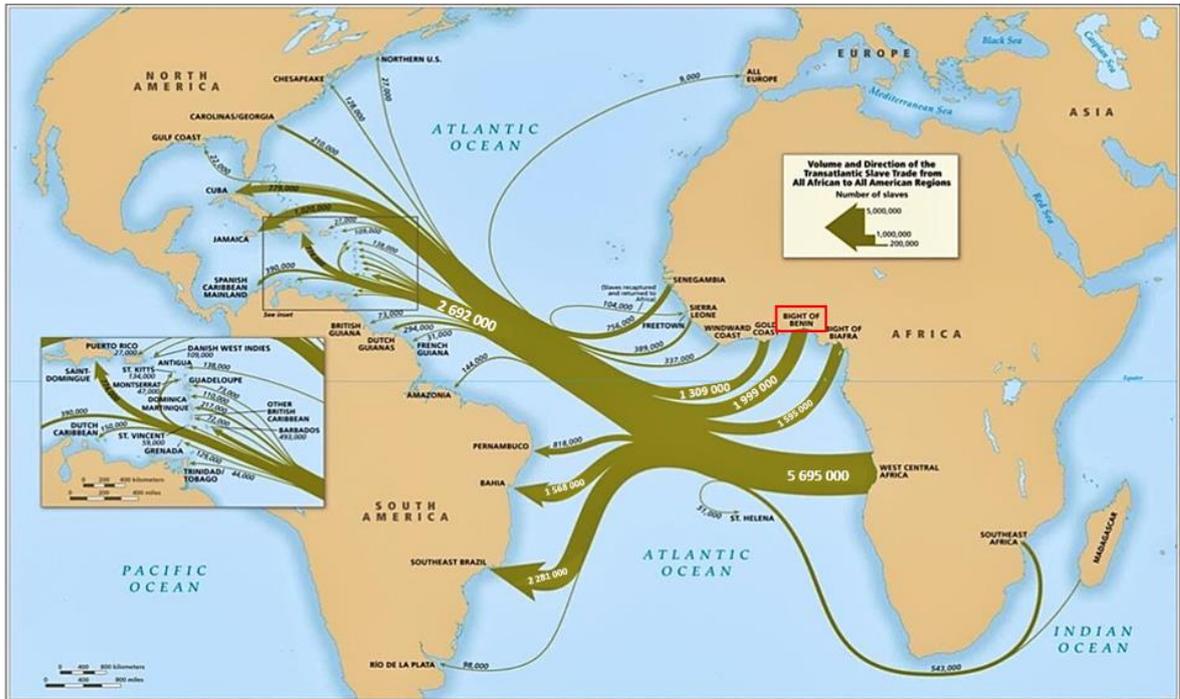
dans le Sud du pays et notamment à Cotonou, la capitale économique (679 012 habitants en 2013 d'après l'ONU). Différentes ethnies sont présentes sur le territoire composant des groupes sociolinguistiques, bien que le français soit parlé par la majorité de la population. Les Fons et les Adjias sont les deux communautés les plus importantes dans le Sud du pays, tandis que ce sont les Baribas et Sombas dans le Nord et les Yorubas au Sud-Est (<https://www.axl.cefan.ulaval.ca/afrique/benin.htm>). D'autres groupes minoritaires existent à travers tout le territoire. Il est intéressant de noter que certains anciens esclaves revenus au Bénin à la fin du XIX^e siècle (Conférence Unesco, 2001) constitueraient un nouveau groupe ethnique avec leurs noms de famille à la consonance portugaise, les « Brésiliens ».

I.2.3.5. Histoire précoloniale et coloniale

Avant d'être la République du Bénin en 1974, le territoire était séparé en plusieurs royaumes, dont le plus grand était le Royaume de Dahomey (du XVII^e au XIX^e siècle). Différents rois s'y succèdent et font la guerre aux royaumes voisins, mais la prospérité est fondée majoritairement sur le commerce d'esclaves (prisonniers de guerre entre les royaumes) du XVII^e à la première moitié du XIX^e siècle. Durant cette période, près de 2 millions de personnes ont été déportés de la Baie du Bénin à travers l'Atlantique (Richardson et Eltis, 2015). La destination définitive des esclaves déportés de cette zone est floue, mais les survivants de la traversée ont probablement fini leur voyage dans les Caraïbes françaises, en Guyane et au Brésil (Figure 13).

Au Bénin, le point de départ de la traversée était à Ouidah et cette ville était un comptoir portugais bien qu'elle ait accueilli des forts d'autres pays européens (français, anglais, danois, hollandais). Avec Lagos (Nigéria), elles étaient les deux principaux ports de la Baie du Bénin : 60% des esclaves africains en ont été déportés (Pétre-Grenouilleau, 2005). A Ouidah, l'achat des esclaves se faisait dans un ordre précis. Tout d'abord, ils étaient rassemblés sur une place dans le centre-ville puis vendus par les rois béninois contre de la marchandise venue d'Europe. S'en suit alors pour les esclaves, enchaînés, une marche sur la Route des Esclaves pour atteindre la plage (environ 4km). Sur la route, ils étaient obligés de tourner autour de l'Arbre de l'Oubli (7 fois pour les femmes, 9 fois pour les hommes) pour laisser toute leur identité (culture, famille, histoire) dans le passé, un rituel pour les briser psychologiquement. Mais l'embarquement ne se faisait pas tout de suite. En attendant l'arrivée des navires, les esclaves étaient généralement « stockés » dans des entrepôts exigus appelés cases Zomaï pendant plusieurs mois. Maltraités pendant la détention, nombreux sont les esclaves à périr avant la traversée, finissant enterrés dans des fosses communes. Pour les survivants, la dernière étape avant l'embarquement était de tourner autour de l'Arbre du Retour : à leur mort, ce rituel garantirait le retour de leur esprit sur la terre de leurs ancêtres.

A.



B.

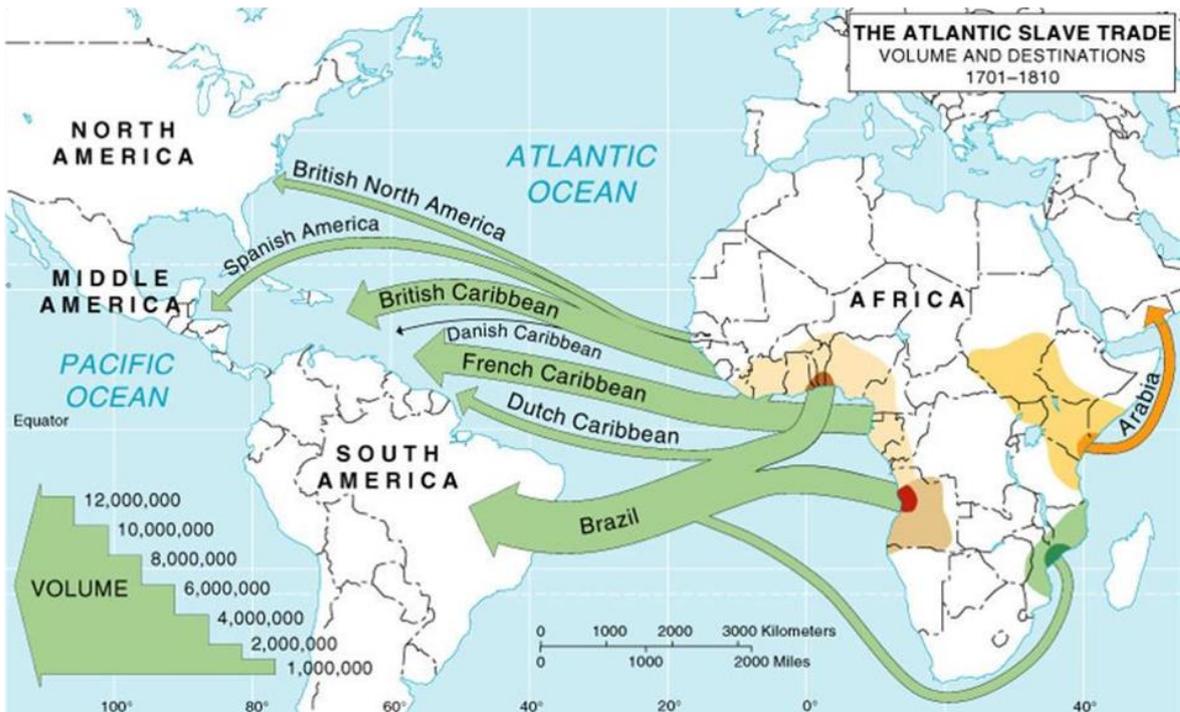


Figure 13 : **A.** Cartographie du nombre total d'esclaves déportés, leur origine et leur destination entre le 16^e et 19^e siècle (Source : Atlas of the Transatlantic Slave Trade de David Eltis et Davis Richardson) ; **B.** Cartographie de la destination précise des esclaves entre le 18^e et 19^e siècle (Source : <https://qph.fs.quoracdn.net/main-qimg-0a69b06d68430708af03bfb8522c8425-c>)



Figure 14 : Statue le long de la Route des Esclaves

Source : photo personnelle

La plupart de ces endroits ont été détruits et sont aujourd'hui remplacés par des statues ou monuments commémoratifs (Figure 14). La Porte du Non-Retour a été érigée à l'endroit où les pirogues venaient récupérer les esclaves pour les amener sur les navires (Figure 15). Beaucoup cherchaient à se suicider à ce moment-là pour éviter la traversée. Mais la traversée elle-même était souvent mortelle, avec un taux de décès d'environ 9% (Miller, 1981).



Figure 15 : La Porte du Non-Retour à Ouidah, monument commémoratif construit au bout de la Route des Esclaves pour les millions de personnes déportés lors de la traite négrière.

Source : photo personnelle

En 1851, le traité commercial et d'amitié signé entre la France et le roi Xogbonou permet à la France de s'installer sur le territoire. L'exode au Bénin continuera jusqu'en 1860.

Avec de nouveaux traités, le Bénin va plus tard céder Cotonou à la France et un protectorat français est signé en 1883. Malgré les attaques du nouveau roi, le mythique Béhanzin, pour récupérer Cotonou en 1890, la colonie du Dahomey intégrera l'Empire colonial Français en 1899. Ce n'est que le 1^{er} août 1960 que le pays accède à l'indépendance, sous le nom de République du Dahomey.

I.3. Problématique et objectifs de cette thèse

L'Europe, l'Afrique et l'Amérique ont toujours eu un lien étroit, avec de nombreux échanges passés mais aussi actuels. Il semblerait ainsi que les échanges Europe/Sénégal aient eu un impact sur les populations de *T. gondii* (Galal et al., 2019a) via l'introduction d'hôtes invasifs comme le rat noir (*R. rattus*) et la souris domestique (*M. m. domesticus*) qui aurait ainsi permis l'importation de souches de Type II depuis l'Europe, mais également leur maintien sur le territoire sénégalais concernant notamment la souris domestique (Dalecky et al., 2015). Avec la mondialisation, les échanges de marchandises se sont intensifiés dans le monde entier et avec eux potentiellement ceux de pathogènes, amenant à l'émergence de nouvelles problématiques.

Le projet ANR IntroTox dans lequel s'inscrit cette thèse a pour objectif d'évaluer l'impact des disséminations d'origines anthropique et environnementale des souches de *T. gondii* sur sa diversité génétique dans les réservoirs animaux en France et en Afrique de l'Ouest et Centrale (Sénégal, Bénin et Gabon).

Ce projet a pour objectif principal d'étudier l'influence humaine sous diverses formes (commerce maritime etc.) et l'influence environnementale (oiseaux migrateurs etc.) sur la structuration des populations du toxoplasme et leur impact sur son épidémiologie. Pour cela, deux continents et quatre pays sont inclus pour étudier ces échanges: l'Europe avec la France et l'Afrique avec le Sénégal, le Bénin et le Gabon. A ces pays s'y est ajoutée l'Amérique du Sud avec le Brésil car troisième pilier du commerce triangulaire.

Les objectifs spécifiques du projet sont de :

- Caractériser les possibilités d'introduction de génotypes d'une origine géographique à l'autre au travers d'isolement de parasites à partir des réservoirs animaux et de caractériser les parasites isolés avec les marqueurs microsatellites
- Caractériser la virulence des souches à l'isolement
- Analyser les échanges génétiques et la persistance de certains gènes dans ces zones via le séquençage de génomes

Ici, le travail de terrain a été réalisé au Bénin avec pour objectif principal de décrire des introductions de souches de *T. gondii* sur son territoire à partir d'isolements animaux et d'évaluer l'influence de l'humain ou d'autres hôtes sur cette diversité suivant l'étude précédemment réalisée au Sénégal (Galal et al., 2019a). Pour cela, nous avons procédé en trois étapes représentant les trois prochains chapitres : **i)** La première étape était de cartographier la diversité génétique du toxoplasme au Bénin, pays pour lequel encore aucun génotype animal (donc autochtone certain) n'avait été décrit, **ii)** étudier la prévalence moléculaire et la diversité génétique de *T. gondii* chez des micromammifères capturés dans différents quartiers de Cotonou et l'impact que pourrait avoir une infection par le toxoplasme chez ces populations d'hôtes et **iii)** initier l'exploration génomique de nouvelles souches de *T. gondii* dans l'idée de découvrir des zones d'introgession dans leur génome.

Chapitre II. Diversité génétique de *Toxoplasma gondii* au Bénin

II.1. Introduction

Avec ce chapitre, nous avons voulu décrire la diversité génétique de *T. gondii* au Bénin par l'isolement de souches et réaliser des analyses de génétique des populations pour déterminer la place des souches béninoises au sein de la diversité mondiale.

Cette étude a donné lieu à l'article suivant :

Article 1 : Azra Hamidović, Jonas Raoul Etougbéché, Arétas Babatounde Nounnagnon Tonouhewa, Lokman Galal, Gauthier Dobigny, Gualbert Houémènou, Honoré Da Zoclanclounon, Richard Amagbégnon, Anatole Laleye, Nadine Fievet, Sylvain Piry, Karine Berthier, Hilda Fátima Jesus Pena, Marie-Laure Dardé, Aurélien Mercier. **A hotspot of *Toxoplasma gondii* Africa 1 lineage in Benin: How new genotypes from West Africa contribute to understand the parasite genetic diversity worldwide**

Accepté le 12 novembre 2020 dans PLOS Neglected Tropical Diseases

II.2. Principaux résultats

Cet article est le résultat de six mois d'investigations de terrain au Bénin et un an et demi d'analyses. L'échantillonnage sur animaux domestiques a été réalisé dans deux villes côtières, Cotonou et Ouidah, et deux villes intérieures, Parakou et Natitingou, ce qui a permis de décrire 39 génotypes après isolement sur souris de laboratoire (sur 45 souches) (Annexe 1) et génotypage à l'aide des 15 marqueurs microsatellites (15 MS). Des analyses en génétique des populations ont ensuite été réalisées avec différents logiciels.

- Sur les 758 animaux domestiques et péri-domestiques (majoritairement des poules et quelques canards et pintades) prélevés pendant les six mois, la séroprévalence générale était de 15,7% (119 animaux séropositifs pour *T. gondii*). Parmi ces animaux séropositifs, 69 tentatives d'isolement ont été faites en modèle murin, dont 45 ont été fructueuses. Le génotypage 15 MS a ensuite permis la description de 39 génotypes complets : 36 Africa 1 (lignée autochtone, virulente pour les souris de laboratoire), 2 Type III (correspondant à 2 isolats clonaux de cette lignée cosmopolite, non virulente pour les souris de laboratoire) et un Africa 4 variant TUB2 (lignée récemment décrite, non virulente pour les souris de laboratoire).
- L'Africa 1 est largement prédominant sur tout le territoire béninois, ce qui est en contraste total avec la répartition géographique de la diversité du toxoplasme au sein d'autres pays d'Afrique sub-saharienne, notamment le Sénégal et le Gabon où la diversité en nombre de lignées retrouvées était plus grande alors que le même

protocole a été utilisé sur un nombre d'échantillons équivalent. Plus particulièrement, aucun Type II (lignée européenne) n'a été retrouvé au Bénin, contrairement au Sénégal où cette lignée a été probablement introduite au cours du commerce triangulaire et colonial.

- Une des premières explications qui pourrait éclaircir les différences entre le Bénin et le Sénégal, serait l'environnement (climat et barrières environnementales). Le Sénégal est caractérisé par un climat sahélien dans le Nord et soudanien dans le Sud, alors qu'au Bénin le pays est quasi entièrement tropical. Il a aussi été discuté dans de précédents travaux que la barrière naturelle représentée par la forêt tropicale aurait isolé des hôtes « adaptés » et aurait permis le maintien de lignées autochtones africaines telles que l'Africa 1 et l'absence du Type II.
- Contrairement au Type III ou à l'Africa 4, l'Africa 1 est une lignée virulente, voire mortelle chez la souris de laboratoire (comme observé pendant nos expérimentations au cours des isolements de souches), mais aussi chez certaines lignées de souris dérivées de lignées sauvages (Hassan et al. 2019). L'absence de *M. m. domesticus*, pour qui l'Africa 1 est mortelle, à l'exception du port de Cotonou pourrait être en lien avec la prédominance de l'Africa 1 sur le territoire béninois. Pour l'instant, la souris et des génotypes avirulents pour elle n'ont pas encore pu s'implanter au Bénin comme se serait le cas au Sénégal, et donc l'Africa 1, comme le suggère notre échantillonnage, est resté majoritaire. Mais cette diversité génétique observée en 2018 au Bénin pourrait changer dans les décades à venir, puisque la dissémination d'espèces invasives de rongeurs est un processus en cours au Bénin (Hima et al., 2019).
- L'Africa 1, bien que principalement retrouvé en Afrique, est également présent au Brésil. La traite transatlantique aux XVIII^e et XIX^e siècles a certainement joué un rôle dans l'importation. Cependant, nos analyses n'ont pas permis de clairement déterminer l'origine géographique de l'Africa 1 au Bénin. La construction de phylogénies basées sur des génomes complets permettraient de mieux comprendre l'histoire évolutive récente de *T. gondii*.

II.3. Article original

A hotspot of *Toxoplasma gondii* Africa 1 lineage in Benin: How new genotypes from West Africa contribute to understand the parasite genetic diversity worldwide

Azra Hamidović¹, Jonas Raoul Etougbéché², Arétas Babatounde Nounnagnon Tonouhewa³, Lokman Galal¹, Gauthier Dobigny^{2,4}, Gualbert Houémènou², Honoré Da Zoclanclounon⁵, Richard Amagbégnon⁶, Anatole Laleye⁵, Nadine Fievet⁷, Sylvain Piry⁴, Karine Berthier⁴, Hilda Fátima Jesus Pena⁸, Marie-Laure Dardé^{1,9}, Aurélien Mercier^{1,9}

¹INSERM, Univ. Limoges, CHU Limoges, IRD, U1094, Tropical Neuroepidemiology, Institute of Epidemiology and Tropical Neurology, GEIST, Limoges, France

²UAC, EPAC, Laboratoire de Recherche en Biologie Appliquée, Unité de Recherche sur les Invasions Biologiques, BP2009, Cotonou, Benin

³Communicable Disease Research Unit (URMaT), Université d'Abomey-Calavi, Cotonou, Benin

⁴Centre de Biologie pour la Gestion des Populations, IRD, CIRAD, INRA, Montpellier SupAgro, MUSE, Montpellier, France

⁵Laboratoire d'Expérimentation Animale, Unité de Biologie Humaine, Faculté des Sciences de la Santé, Université d'Abomey-Calavi, Cotonou, Benin

⁶Laboratoire de biologie médicale, Centre Hospitalo-Universitaire de la Mère et de l'Enfant Lagune (CHU-MEL), Cotonou, Bénin

⁷UMR216-MERIT, IRD, Université Paris-5, Sorbonne Paris Cité, Paris, France; Centre d'Etude et de Recherche sur le Paludisme Associé à la Grossesse et à l'Enfance (CERPAGE), Cotonou, Bénin

⁸Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

⁹Centre National de Référence Toxoplasmose/*Toxoplasma* Biological Resource Center, CHU Limoges, Limoges, France

Abstract

Through international trades, Europe, Africa and South America share a long history of exchanges, potentially of pathogens. We used the worldwide parasite *Toxoplasma gondii* to test the hypothesis of a historical influence on pathogen genetic diversity in Benin, a West African country with a longstanding sea trade history. In Africa, *T. gondii* spatial structure is

still non-uniformly studied and very few articles have reported strain genetic diversity in fauna and clinical forms of human toxoplasmosis so far, even in African diaspora.

Sera from 758 domestic animals (mainly poultry) in two coastal areas (Cotonou and Ouidah) and two inland areas (Parakou and Natitingou) were tested for *T. gondii* antibodies using a Modified Agglutination Test (MAT). The hearts and brains of 69 seropositive animals were collected for parasite isolation in a mouse bioassay. Forty-five strains were obtained and 39 genotypes could be described via 15-microsatellite genotyping, with a predominance of the autochthonous African lineage Africa 1 (36/39). The remaining genotypes were Africa 4 variant TUB2 (1/39) and two identical isolates (clone) of Type III (2/39).

No difference in terms of genotype distribution between inland and coastal sampling sites was found. In particular, contrarily to what has been described in Senegal, no type II (mostly present in Europe) was isolated in poultry from coastal cities. This result seems to refute a possible role of European maritime trade in Benin despite it was one of the most important hubs during the slave trade period. However, the presence of the Africa 1 genotype in Brazil, predominant in Benin, and genetic analyses suggest that the triangular trade was a route for the intercontinental dissemination of genetic strains from Africa to South America. This supports the possibility of contamination in humans and animals with potentially imported virulent strains.

Author summary

The parasite *Toxoplasma gondii* is a worldwide-distributed pathogen, able to infect all warm-blooded animals. There are important differences in the clinical expression of the infection in direct relation with the parasite genetic profile. In some regions, the geographical structuration of its genetic diversity points towards a crucial role of human activities in some lineages introduction or sorting. Benin is a West African country with a history of extensive transcontinental exchanges. Our genetic study of *Toxoplasma* in Benin shows a surprisingly homogeneous and autochthonous diversity, which contrasts with previous studies from other West and Central African countries. In Benin, the absence of European *Toxoplasma* lineages

may be explained by the extreme rarity of the house mouse (*Mus musculus*), a host species that was previously described as highly susceptible to the mouse-virulent African strains. Might Benin be the origin region for the Africa 1 lineage, our results suggest that Guinean Gulf coasts may be a starting point of this lineage towards South America, especially Brazil, during the slave trade. As a whole, the present study provides further insights into the recent evolutionary history of *Toxoplasma gondii* and its consequences on human and animal health.

Introduction

The protozoan *Toxoplasma gondii* is an obligate intracellular parasite responsible for toxoplasmosis. Its life cycle is complex and involves multiple hosts. Felids, as definitive hosts, excrete the parasite oocysts produced after sexual reproduction in their digestive tract [1,2]. Intermediate hosts (all warm-blooded animals) may then be infected by ingesting oocysts present in the environment [3]. Key reservoir species include rodents, which are felids preferred preys. Other ground-foraging animals, such as poultry, are good bioindicators of *T. gondii* circulation in the environment [4].

In humans, the infection source varies depending on hygiene and eating habits [2]. With an estimated 25% of the world population being infected asymptotically [5], *Toxoplasma* infection does not appear to be a public health priority, especially on tropical continents such as Africa where much more morbid infections like malaria or tuberculosis are widespread [6]. Yet, toxoplasmosis may be lethal in some large at-risk groups like fetuses or immunocompromised patients [3], but also in immunocompetent patients with severe forms of toxoplasmosis mainly described in South America [7,8]. Some investigations have shown that a link exists between the parasite genotype and the virulence in both mouse [9] and human [5,6,10]. Though the underlying processes remain unknown, such a relationship enhances the importance of documenting *T. gondii* genetic diversity and structure. In sub-Saharan Africa, data on both the genetic diversity of *T. gondii* and the clinical forms associated with this zoonotic disease are scarce [11–14]. However, in West and Central Africa, it was shown that ocular toxoplasmosis could be an important health issue [15] and that cerebral toxoplasmosis

was found to be the second cause of death after tuberculosis among HIV-positive patients [10]. In addition, a recent study conducted in France has described cases of severe toxoplasmosis imported from tropical Africa in immunocompetent patients and associated with strains belonging to the Africa 1 lineage [16]. Therefore, further data on the diversity of *Toxoplasma* from this continent are required to better understand the eco-evolution of the pathogen and the risks for human health.

The Republic of Benin, formerly Dahomey, is located in West Africa, surrounded by Togo, Nigeria, Burkina Faso and Niger. Currently, Benin has an important maritime commerce through its International Sea port of Cotonou [17] with importation of vehicles, rice, fuels and palm oil (<https://www.tresor.economie.gouv.fr/Pays/BJ/commerce-exterieur-du-benin>) and exportation of raw cotton (34.5% of exportations), coconuts, Brazil nuts and cashews and gold to, inter alia, India, Bangladesh, China, United Arab Emirates and Vietnam (oec.world/en/profile/country/ben/).

During the 17th century, the region was referred to as the Slave Coast [18]. Benin was a major source of African slaves during the so-called Atlantic triangular trade: raw cotton was shipped from America to Europe where it was manufactured and then sent to Africa. There, it was traded for slaves who were deported to Americas (an estimated two to three millions of people were deported from the Bight of Benin; [19,20]) (<http://revealinghistories.org.uk/africa-the-arrival-of-europeans-and-the-transatlantic-slave-trade/articles/commerce-and-collecting.html>).

Recent evidence has shown that *T. gondii* was already present in Africa 2,000 years ago [21]. However, such extensive and long-term intercontinental exchanges may have fueled the dissemination of many organisms to and from coastal Africa, and this could include pathogens such as non-autochthonous lineages of *T. gondii* through the accidental (e.g. rats) or deliberate (e.g. cats) importation of their hosts from Europe [4,22]. Interestingly, invasive species introduced into Africa may have long remained along the coasts for a while before being disseminated further inland due to late development of inland transports (e.g. rats and mice in Senegal [23,24]; rats along the Benin-Niger corridor [25]). It is thus feasible that this past

maritime trade have shaped differences in genetic diversity and population structure of *T. gondii* between continents, but also between coastal and inland areas within Africa. In such context, the main objective of the present study is to map *T. gondii* genetic diversity across diverse regions of Benin and to compare the observed diversity to that found elsewhere in Africa but also Brazil, final destination of millions of slaves for three centuries.

Methods

Ethics statements

The Ethical Committee of Research of the Institut des Sciences Biomédicales Appliquées (ISBA), Cotonou, authorized this research in Benin (N°112 the 20/08/18). All experimental procedures were conducted according to European guidelines for animal care ("Journal Officiel des Communautés Européennes", L358, December 18, 1986).

In agreement with the equitable sharing of genetic resources between Benin and France, a Nagoya Protocol on Access and Benefit Sharing was also accepted by the focal point in Cotonou.

Sampling sites

Four cities of Benin were sampled from May to October 2018. In the south, two coastal cities were selected: Cotonou (6°23'25.4"N 2°23'58.6"E), the actual economic capital with a large international commercial seaport, and Ouidah (6°22'17.3"N 2°04'29.4"E), an ancient major seaport for the exportation of slaves and goods to the Americas and Caribbean Islands [19,20]. In the north, two inland cities were investigated: Parakou (9°20'43.5"N 2°36'20.3"E), an ancient and still important crossroad between Benin, Nigeria, Burkina Faso and Niger, and Natitingou (10°17'46.4"N 1°22'56.2"E), the closest city to the Pendjari National park, one of the last large wildlife refuge in West Africa.

In each sampling sites, multiple neighborhoods and villages were sampled, with the systematic oral authorization of owners, village/neighborhood traditional chiefs and representatives of local administrations.

Poultry sampling

Sampling was performed on 758 domestic animals, mainly hens (*Gallus domesticus*, n=746) but also ducks (*Anas platyrhynchos*, n=10), one guinea fowl (*Numida meleagris*) and one turkey (*Meleagris gallopavo*). Individual (age, sex, place of birth) and environmental (soil type, source of water, GPS coordinates at the household level) information were noted for each animal. They were then identified using a ring, an individual number and a picture. Blood was collected from a wing vein using a syringe with a 25G needle and stored at 4°C. Samples were then centrifuged to separate the serum from blood cells, and immediately serotested on the field.

***Toxoplasma* Serological examination**

Sera from domestic animals and laboratory mice (see below) were screened for *T. gondii* IgG antibodies using the Modified Agglutination Test (MAT) (Toxoscreen DA kits from Biomérieux®) [26] with serial dilutions (1:20, the positivity threshold, 1:40, 1:100 and 1:800) as described in the literature [27].

Strain isolation protocol

Seropositive animals were bought to the owners and slaughtered. Heart and brain were collected, preserved at 4°C or on ice and processed at the ISBA laboratory (Cotonou) within the next five days. The isolation protocol on Swiss mice follows the description by Galal and collaborators in 2019 [4]. Cryogenized tissue samples of seropositive mice were then stored in liquid nitrogen at the *T. gondii* Biological Resource Centre (BRC), Limoges, France, (<http://www.toxocrb.com>) for strain preservation and subsequent sub-inoculation.

15-Microsatellite genotyping and genetic analyses

DNA extraction and qPCR. *Toxoplasma* DNA extraction from tissues and biological exudates (mouse brain or ascites and poultry tissue digests) was performed with QIAamp® DNA mini kit (Qiagen).

The real-time qPCR targeting the non-coding element rep529 (GenBank accession no. AF146527) was used to test to assess the parasitic load of *Toxoplasma* in digests from domestic animals and tissues from seropositive laboratory mice with an unsuccessful *T. gondii* genotyping.

Microsatellite genotyping. A 15 microsatellite (MS) markers multiplex PCR was performed as previously described [28]. The 15 loci used are located on 11 different chromosomes of *T. gondii* genome. Among those, some of them are sparsely polymorphic and rather help typing the strain (TUB2, W35, TgM-A, B18, B17, M33, IV.1 and XI.1) while others are highly polymorphic and enable one to distinguish between strains from a same type (M48, M102, N60, N82, AA, N6 and N83). The Beninese multi-locus genotypes (MLGs) were compared to reference strains described in previous studies (S1 Table) in order to allow the assignment.

Construction of a Neighbor-Joining tree. The Brazilian strains (that were published using different genotyping techniques [29–35]) were reanalyzed with the 15-MS genotyping panel described here above. Then, genetic diversity among Beninese (this study), Senegalese [4,14], Gabonese [11] and Brazilian [29–35] *T. gondii* populations (all animal strains) were explored using the software Populations 1.2.32 (1999, Olivier Langella, CNRS UPR9034 <http://bioinformatics.org/~tryphon/populations/>). To do so, genetic distances (Cavalli-Sforza and Edwards, Dc (1967)) between unique haplotypes from the same locality were calculated and used to reconstruct a Neighbor-Joining tree. All genotypes retrieved in the present study as well as reference strains used to build this distance-based tree are listed in S1 Table.

Geographical structure, genotypic and genic diversity. Spatial and diversity analyses were performed only on Africa 1 genotype samples since they were the only ones to be sufficiently well represented (36/39; see Results). The software QGIS V2.18.15 (qgis.org) was used to map the geographical distribution of the sampling locations of the corresponding genotypes. Various diversity indices (Shannon-Wiener diversity index H; Stoddart and Taylor's index G; Simpson's index lambda; Evenness E.5) were calculated on R version 3.4.3 using a Poppr function called "diversity_ci". For these analyses, all strains, even epidemiological clones, were included.

For genic diversity, epidemiological clones of a same GPS point were excluded of this analysis in order to prevent biased clustering. To assess the population structure of *T. gondii* in Benin, as well as to explore potential geographic exchanges and flows, genic differentiation analysis

for each pair of population within Benin (namely Cotonou, Ouidah, Parakou and Natitingou) as well as trans-continently (i.e. between Benin, Senegal, Gabon and Brazil) was performed via Genepop (<https://kimura.univ-montp2.fr/~rousset/Genepop.htm>) with 100 batches and 5,000 iterations per batch as Markov chain parameters. A p-value for each population pair across all polymorphic loci (M48, M102, N60, N82, AA, N6 and N83) was calculated with Fisher's method.

Minimum spanning network. A minimum spanning network using Poppr package on R version 3.4.3 was drawn to visualize the relationships between Africa 1 genotypes from Benin, Senegal, Gabon and Brazil based on Bruvo's genetic distance [36].

Mouse virulence

We took advantage of the four weeks long isolation protocol (see above) to investigate parasite virulence. To do so, mouse survival was monitored within the four weeks in order to determine *a posteriori* the association between *Toxoplasma* genotype and infection phenotype in mice [22]. Doses of parasites initially present in inocula were arranged into three classes (>25, [25-100[, ≥100 parasites) with a qPCR-based estimation of parasites within digest samples (S1 Table). Once again, only *Africa 1* strains from Benin were included in this particular analysis due to the number of samples and data available. The relation between survival time and dose was studied using a Cox proportional-hazard regression analysis and a Kaplan-Meier method [11] implemented in IBM SPSS Statistics 22.0.

Results

Sero-epidemiology of *T. gondii* in poultry

A total of 758 animals were sampled and led to an overall seroprevalence of 15.7% (n=119/758) (95% IC: 13.1-18.3). Differences with overlapping IC were noted between cities: 21.2% (28/132; 95% IC: 14.24-28.19) in Cotonou, 17.5% (36/206; 95% IC: 12.29-22.66) in Ouidah, 13.9% (29/208; 95% IC: 9.23-18.65) in Parakou and 12.3% (26/212; 95% IC: 7.85-16.68) in Natitingou (26/212).

Isolation, virulence and genotyping of *T. gondii* isolates from Benin

Out of the 119 seropositive poultry, 69 isolations were attempted and 45 ones were successful. Among the latter ones, 39 could be genotyped using 15-MS genotyping (Fig 1): 36 strains were Africa 1 (the eight typing markers matching with reference strain “FOU”; see S1 Table) with 27 distinct MLGs. They were virulent for laboratory mice with the rapid development of an ascitic fluid usually followed by euthanasia or death after puncture, with 50% of mice being dead at day 10 p.i. (Fig 2). Two others strains from the region of Ouidah were found to be clones of Type III (non-virulent for mice) and produced cysts in the brain of three laboratory mice four weeks p.i. (respectively a total of 80, 128 and 24 cysts per brain).

Fig 1. Geographical distribution of Senegalese (modified from Galal et al., 2019), Beninese and Gabonese *Toxoplasma gondii* strains.

Map of the distribution of *Toxoplasma gondii* of isolates fully genotyped by 15-MS genotyping. Size of pie charts correlate with the total number of isolates and colors indicate the different clonal lineages found.

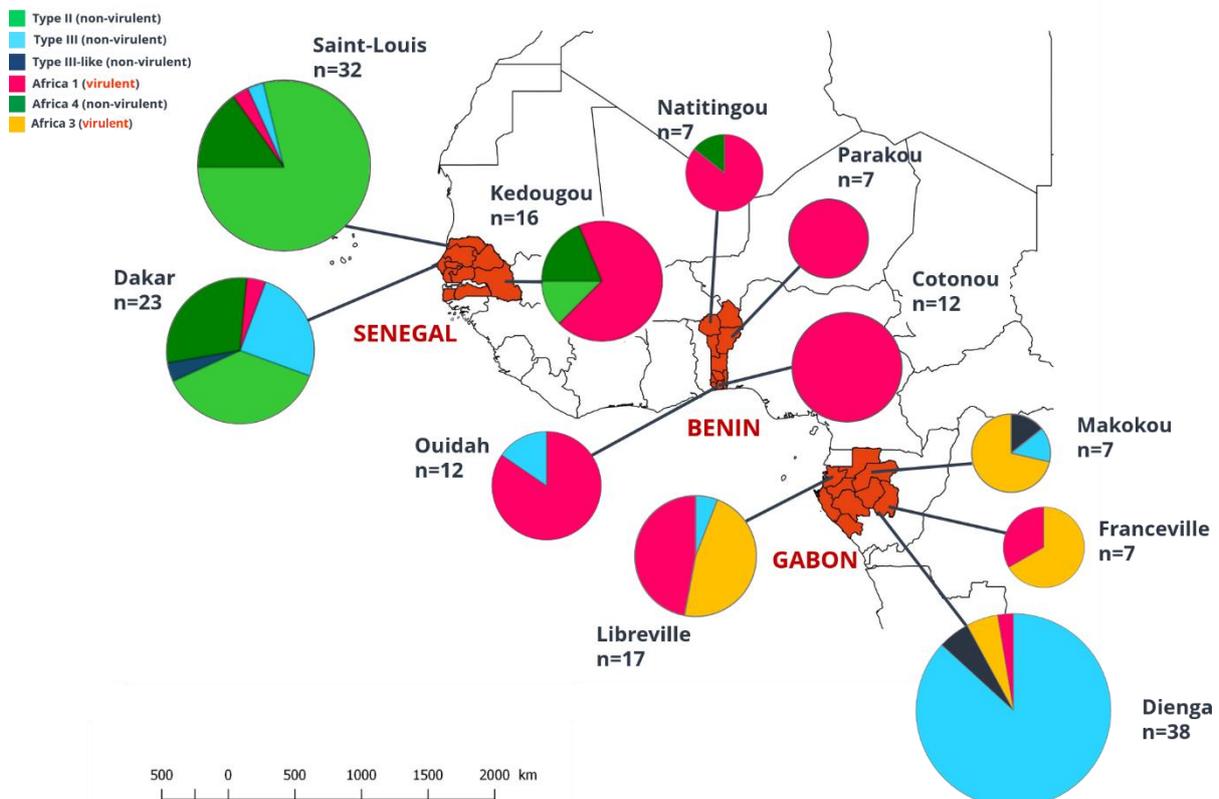
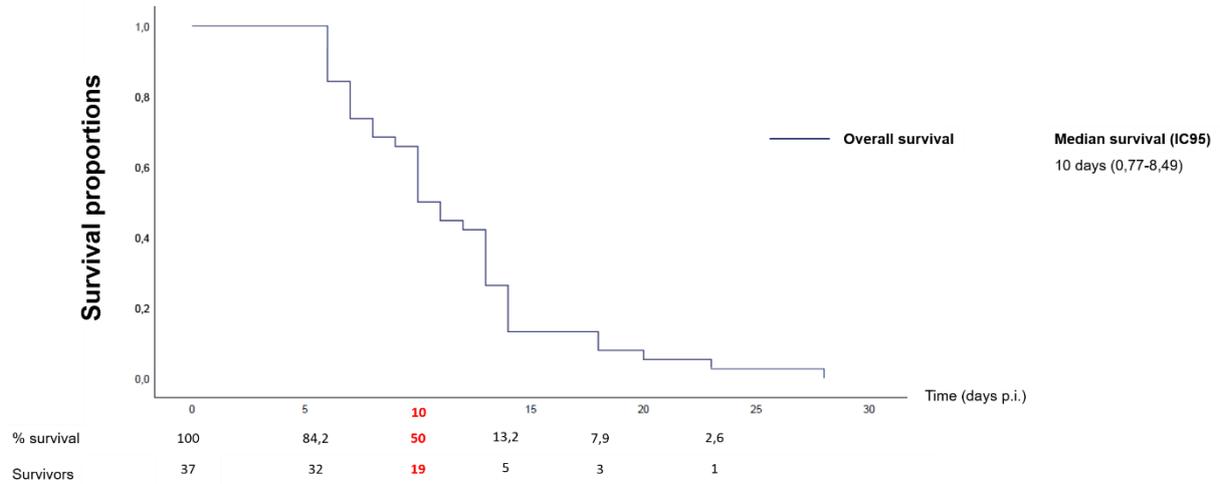


Fig 2. Survival curve of Swiss mice infected by *Africa 1* strains from Benin



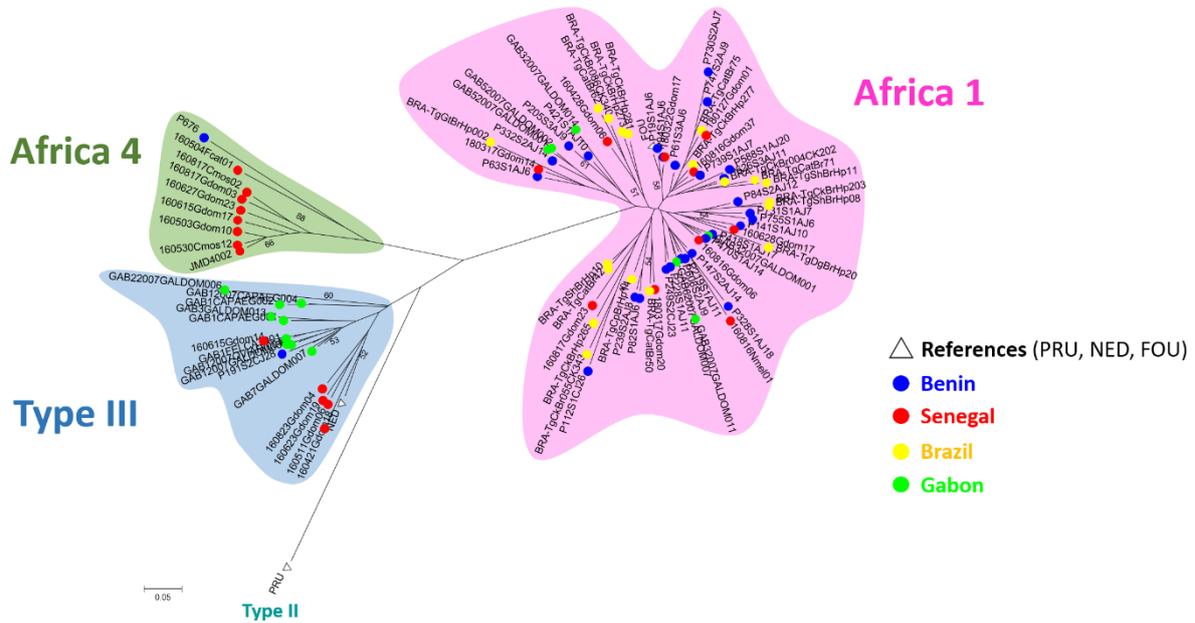
During the isolation protocol, seven strains lead to an apparently asymptomatic infection, with a positive serology but no brain cyst by direct microscopic examination and unsuccessful genotyping probably due to insufficient DNA amount (positive sample in qPCR but Ct > 34) or unsuccessful sub-inoculation of frozen aliquots back to France. Among those isolation attempts, only one of the inoculated digest could be genotyped and corresponded to Africa 4 variant TUB2 (293pb instead of 291pb) (S1 Table).

Genetic structure and genotypes geographical distribution

The different genotypes found in Benin and in two other African countries, Senegal [4,14] and Gabon [11] are illustrated in Figure 1. In Benin, Africa 1 is the dominant genotype from South to North.

The phylogenetic distance-based tree separates the strains from Africa, Europe and South America into three different haplogroups that correspond to Africa 1, Type III and Africa 4 genotypes (Fig 3). No clear structure was retrieved within the Africa 1 lineage. In contrast, the Type III group appears divided into three clusters: one made of only Senegalese genotypes, a second one with only Gabonese genotypes and a third one with the single Type III genotype from Benin together with some strains from Senegal and Gabon.

Fig 3. Global Neighbor-joining tree of genotypes inferred from calculated Cavalli-Sforza distances for 15 microsatellite markers



Africa 1 population genetics within Benin and comparison with strains from Senegal, Gabon and Brazil

The sample size of Africa 1 strains allowed us to focus on that particular lineage and to perform population genetic analyses on 27 Africa 1 MLGs from Benin, six from Gabon, 12 for Senegal and 19 from Brazil (Table 1). Values point to similar diversity within Senegal and Brazil, a slightly higher diversity in Benin and a lower one in Gabon, where a possibly more clonal population is observed, although this was based on a smaller sampling size.

Table 1. *Toxoplasma gondii* genetic diversity and genotypic diversity.

Pop	N	MLG	eMLG	SE	H	H_rar	G	G_rar	lambda	lambda_rar	E.5	E.5_rar	Hexp
Benin	36	27	9,10	0,844	3,17	2,452017	20,25	11,070675	0,951	0,9072449	0,845	0,9361424	0,214
Gabon	8	6	6,00	0,000	1,67	1,667462	4,57	4,571429	0,781	0,7812500	0,831	0,8308155	0,187
Senegal	15	12	8,33	0,826	2,34	2,282658	8,33	8,097062	0,880	0,8749082	0,783	0,8006349	0,194
Brazil	26	19	8,69	0,935	2,81	2,377141	14,08	10,059880	0,929	0,8975714	0,837	0,9124291	0,248

Genetic diversity and genotypic diversity of Africa 1 estimated for Benin, Gabon, Senegal and Brazil. (N: number of genotypes; MLG: multilocus genotypes; eMLG: expected MLG based on rarefaction; SE: standard error from rarefaction; H: Shannon-Wiener diversity index; H_rar: Shannon-Weimer diversity index after rarefaction; G: Stoddard and Taylor's index; G_rar: after rarefaction; Lambda: Simpson's index; Lambda_rar: Simpson's index after rarefaction; E.5: evenness; E.5_rar: evenness after rarefaction; Hexp: Nei's gene diversity (expected heterozygosity))

No significant genetic differentiation was found between pairs of localities within Benin (Table 2). The same analysis performed worldwide (i.e. Benin, Senegal Gabon and Brazil) shows that Benin and Senegal are the only two countries with no significant differentiation (p-value = 0.37) (Table 3) although no obvious common allele was found between each strains of these populations through the MS-genotyping. The minimum spanning network indicates that the Africa 1 strains isolated in Africa and Brazil are closely related (Fig 4); however, no country-specific genetic affinities are observed.

Table 2. P-value for each population pair of Beninese regions across all loci (Fisher's method)

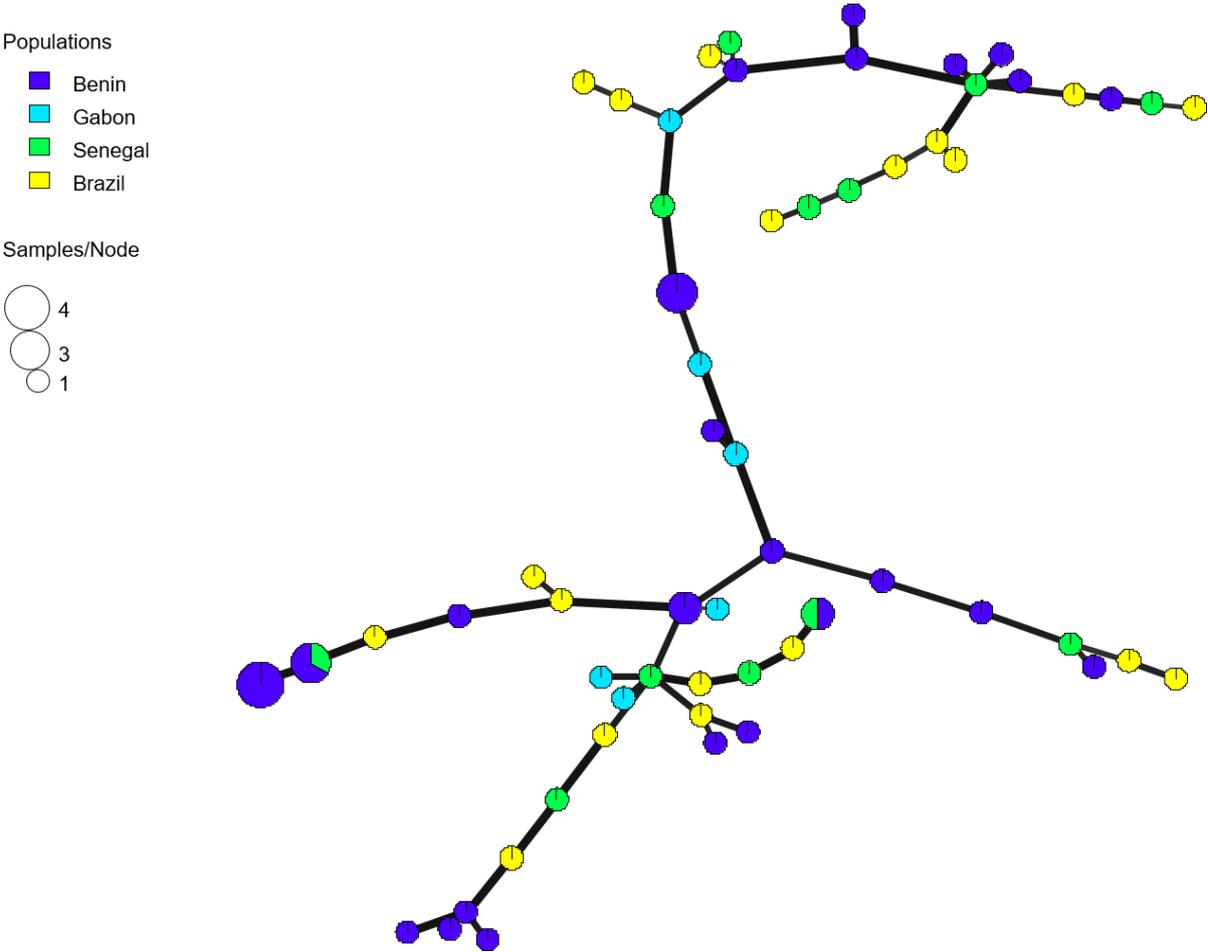
Population pair	Chi2	df	P-value
Cotonou & Ouidah	8.22146	12	0.767593
Cotonou & Parakou	10.139427	12	0.603730
Ouidah & Parakou	10.208334	12	0.597689
Cotonou & Natitingou	5.630950	12	0.933532
Ouidah & Natitingou	5.659725	12	0.932255
Parakou & Natitingou	3.100918	10	0.978948

Table 3. P-value for each population pair of countries across all loci (Fisher's method)

Population pair	Chi2	df	P-value
Benin & Senegal	15.06522	14	0.373711
Benin & Gabon	26.702961	12	0.008525
Senegal & Gabon	21.169324	12	0.047955
Benin & Brazil	38.402169	12	0.000132
Senegal & Brazil	27.248545	14	0.017870
Gabon & Brazil	>61.870083	12	<1.03e-008

Fig 4. Minimum spanning network (MSN) showing the relationships between multilocus genotypes (MLGs) of *Africa 1* lineage from Benin, Senegal, Gabon and Brazil.

Thick and dark lines show MLGs that are more closely related to each other.



Discussion

Over the last two decades, the picture of the genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in Africa has been slowly drawn thanks to accumulating data and an increasing sampling size [13]. Nevertheless, West Africa remains one of the least documented region of the world in terms of number of isolates and genotypes described. This study significantly contributes to filling such a gap of knowledge with the description of 39 *T. gondii* genotypes from Benin, compared to available microsatellite data of *T. gondii* diversity from West (Senegal) and Central Africa (Gabon). It also allows us to investigate the influence of intercontinental exchanges and the potential heritage of the triangular trade on shaping *T. gondii* genetic diversity.

We found three different *T. gondii* lineages that circulate in Benin: Type III, Africa 4 and Africa 1. The Type III clone (2 strains), corresponding to a cosmopolitan lineage already described in various countries on the Africa continent [13], were found in Ouidah, a former Portuguese fort where slave export was once extensive [37]. Type III distribution and circulation remain mysterious, with description of this genotype all around the globe and in both anthropized and isolated areas [4,11,38].

One single Africa 4 sample was successfully genotyped from Boukoubé, a village at the Togolese border, 80 km east of Natitingou in a remote area. Africa 4 lineage (equivalent to RFLP genotype ToxoDB#20) is a widespread lineage in Africa (Egypt, Ethiopia, Senegal, Mali and Gambia), and was repeatedly found in Asia (China, Sri Lanka, United Arab Emirates) [13]. However, the strain isolated in this study was an Africa 4 variant TUB2 (equivalent to ToxoDB#137 [39]), which is a quite uncommon variant of this lineage since it was only described in three African countries (Senegal, Ghana and Mali) [4,13]. This sample was directly genotyped from a digest since the strain isolation “failed”: no clinical virulence in laboratory mice and no cerebral cyst were observed despite the positive serological test as well as the positive qPCR reaction on the brain. However, the low DNA amount detected in mouse brains (Ct=38.37) could explain the genotyping failure. This atypical pattern has already been observed in a previous study on Senegalese strains belonging to the Africa 4 lineage. In our study, four other isolation attempts within the same village (Boukoubé), without successful genotyping, also showed a similar isolation pattern. Given the geographical proximity and the

sharing of this phenotypic trait, it is highly probable that these strains also belong to the Africa 4 lineage. These observations may highlight a bias in the widely used *T. gondii* isolation protocol. The use of a mouse model could disallow the isolation and/or characterization of certain strain genotypes by selecting a part of the diversity inducing a lower DNA amount in the host brain (seemingly, the case for the Africa 4 lineage). The use of knocked-out immunosuppressed mice [40] may solve such a problem but brings ethical concerns and other technics like cell culture are to optimize. However, these two methods would be complicated to implement without proper infrastructures to maintain sterile conditions, which are usually lacking in tropical regions. Considering these limits, our protocol remains the reference technique for now.

Aside from these two lineages, Africa 1 strains were the most widespread (36/39 characterized strains) and were found all over Benin. This lineage is predominant in tropical Africa since it was found in 11 countries (from Guinea to Democratic Republic of the Congo and more sparsely in East Africa) [13] and is regularly detected in France among imported cases in African patients with symptomatic toxoplasmosis by the National Reference Centre (CNR) for Toxoplasmosis [16]. Interestingly, two Africa 1 strains from Cotonou were respectively identical for the 15 MS to two other strains isolated from a pregnant woman and an immunocompromised patient in Denmark [41]. Although the use of microsatellites may lead to some homoplasy, such a risk is probably limited here by the number of markers used, especially since our 15 loci are distributed along 11 out of the 14 *Toxoplasma* chromosomes [28]. Therefore, these patients were probably imported cases (infection in Africa), but due to the absence of associated data, we cannot confirm that these patients were from, or travelled to Benin.

In Benin, no genic differentiation between the Africa 1 populations from the four sampled regions was observed, which may support a recent dissemination of this lineage across the country, or reflect an extensive circulation of strains between the four Beninese regions. Its nearly exclusive occurrence in all sampled regions is in great contrast with what was previously observed in Senegal [4] and Gabon [11] where two to five lineages are co-occurring in most

regions (Fig 2). However, it has to be noted that port regions, the most likely regions in which introduced lineages are expected to be found, were not thoroughly sampled in Gabon as it is the case in Senegal and Benin. So how such different diversity patterns between these three countries could be explained?

First, the absence of the European Type II in Benin and notably on the coast, in contrast to the hypothesis of an introduction of this lineage during the triangular trade in Senegal [4], is surprising since the two countries had a rather similar precolonial and colonial history with Europe. Benin may have had an even more prominent role in the triangular slave trade, with nearly two million slaves leaving the Bight of Benin from 1501-1867 (and more than one million just from Ouidah) while “only” 145.000 slaves were deported from Saint-Louis in Senegal [19]. If the difference is not in the route of introduction of type II strains, the explanations could be related to different factors enabling the persistence of this lineage in these new territories.

One difference between Senegal and Benin is the climate [42]: Senegal is characterized by a typically Sahelian (in the north) and a Sudanian climate (in the south) while Benin has a more tropical climate, from tree savannas (in the north) to subequatorial rain regime (in the south). The possible relationships between this marked climatic demarcation and the *Toxoplasma* genotypes diversity has already been discussed [13]. In this article, Galal and collaborators proposed that tropical Africa has been isolated from new hosts for quite a long time due to natural barriers such as the Sahara desert and a dense tropical forest, thus resulting in a singular *T. gondii* diversity within hosts living in the tropical area with autochthonous lineages such as Africa 1 [13]. Highly productive biotopes such as the tropical environment probably allow potential hosts of *T. gondii* to allocate a large amount of energy to the evolution of their resistance to pathogens that are abundant there [43]. This could lead to a general increase in the virulence of pathogens [44], including strains of *Toxoplasma* circulating in that environment. These processes would have allowed the selection of more virulent lineages (as seen with experimental mouse models) such as Africa 1. This could also explain the lack of success of the type II lineage to propagate in such tropical environments [13,22,45] both in Africa such as Benin and Gabon, and in South America due to a lack of adaptation of this

lineage to this new environment (host immune system and competition with pre-existing and better-adapted indigenous lineages).

The Africa 1 lineage is highly virulent (if not lethal) in laboratory mice [4,11], but also in wild-derived mice [46]. In Senegal, since their introduction to the coast through past maritime trade, the spatial expansion of invasive rodents, mainly the house mouse *Mus musculus domesticus* and the black rat *Rattus rattus*, was driven by road- and river-mediated commercial exchanges [24,47]. It was found that strains of Africa 1 lineage are today seldom found in the port regions of Senegal where the house mouse is the most abundant commensal rodent [24,47] and where non-virulent lineages (type II, followed by type III and Africa 4) appear to be far more common [4]. The opposite was noticed in the inland region of Kedougou where the house mouse has not disseminated yet (Fig 2). To explain this contrasting pattern in the geographical distribution of *T. gondii* lineages in Senegal, Galal and collaborators [4] proposed that the house mouse could have allowed the introduction of the intercontinental lineages type II and type III in the port regions of Senegal and the maintenance of this lineages in these regions, beside the non-virulent lineage Africa 4. The successful invasion of these regions by the house mouse would have gradually eliminated Africa 1 lineage from these areas due to its marked virulence for this species, which is probably the most important prey of cats in this areas. In Benin, a large small mammal survey could not provide any evidence of house mice with the only exception of Cotonou Seaport [25]. This rodent species has therefore not (yet) influenced *T. gondii* populations in this country. In support to such a hypothesis, a similar match between the relative abundance of house mice and the frequency of virulent (Africa 1 and/or 3) vs. non-virulent (Type III) *Toxoplasma* strains was observed in Gabon (Franceville vs. Makokou; Fig 2) [48].

At the opposite, the most abundant rodents captured in Benin are the native African *Mastomys natalensis*, beside the invasive black rats *R. rattus* and Norway rats *R. norvegicus* [25]. *Mastomys natalensis* was experimentally shown to be resistant to the virulent strains of Type I [49]; and is therefore probably also resistant to Africa 1 since it shares common virulence alleles with Type I [50]. *Rattus norvegicus* is known to be highly resistant to mouse-virulent *T.*

gondii strains [51]. No data about the resistance of *R. rattus* to the different *T. gondii* strains is available, but its importance as a significant reservoir for *T. gondii* is doubtful, given that it is an arboreal species, probably having a limited exposition to the oocysts on the soil. The only study from Africa reporting data about the prevalence of *T. gondii* infection in *R. rattus* was from Senegal, where a very low molecular prevalence was found [14].

The composition of the host community, particularly the absence of *M. m. domesticus* from Beninese territory outside the port of Cotonou, together with the probable resistance of these hosts may explain the absence of type II lineage and the Africa 1 lineage predominance in Benin. Our results would therefore support the hypothesis of an important role of *T. gondii* hosts in giving a selective advantage to some *T. gondii* strains [52,53], shaping its population structure [4,14]. This would mainly concern hosts that actually play an important role in maintaining the transmission cycle of *T. gondii*, namely rodents. These small mammals are indeed the main prey of the domestic cat and are considered the main reservoir of *T. gondii* in the domestic environment. If true, one would expect that the *Toxoplasma* genetic diversity observed in 2018 in Benin will change in coming decades since the dissemination of invasive rodent species (especially the house mouse) is most probably an ongoing process in Benin [25]. Studies on the comparative virulence of different *T. gondii* strains on native African and invasive rodents should be helpful to test this hypothesis.

Although Africa 1 lineage has mainly been described throughout the tropical zone of the African continent (West and Central Africa) with numerous strains, it has also been reported more anecdotally in Brazil (equivalent to PCR-RFLP haplogroup 6) [29–35,39]. In previous studies using fewer markers, genetic proximity had already been found between some of these strains from the two continents and the authors hypothesized a role of the transatlantic slave trade in the 18th and 19th centuries [12,13]. In our study, despite a significant genic differentiation between certain geographical populations of Africa 1 lineage, other analyses (Neighbor-Joining tree, minimum spanning network) showed no genetic differentiation between strains of this lineage. It is expectable that, since the collapse of the trade activities linking Africa to South America by the end of the transatlantic trade, geographical populations of this lineage may

have gradually diverged due to their isolation. In a former study, Su and collaborators also came to that conclusion using PCR-RFLP approach by classifying Africa 1 equivalent strains from Brazil mainly in the haplogroup 6, such as FOU (the Africa 1 reference), but also in the haplogroup 14 with an Africa 3 equivalent [39]. However, their analyses found a moderate genetic separation between these two groups, probably influenced only by the geographical separation. Unfortunately, our microsatellites analyses did not allow us to clearly certify the origin of Brazilian Africa 1 strains. Despite that, the wide distribution of this lineage in Africa (from Senegal to Uganda) and its high prevalence in most countries of West and Central Africa is supportive of an introduction starting from Africa to South America, as only limited populations of this lineage were found only in Brazil (*T. gondii* diversity have been thoroughly explored in South America) [13,45]. The inference of the Africa 1 evolutive history will probably require the use of more informative methods, such as high throughput genomics to build phylogenies based on complete genomes of these strains, which has not been done yet with *T. gondii* due to the lack of Africa 1 genomes published from these two regions [55].

As with many zoonoses, exploration of the wild cycle for a global understanding of a pathogen epidemiology should be considered, like in the Pendjari Park (Benin), but remains difficult on safety grounds. For *T. gondii*, except for a few single strains [4], no data exist for African wildlife and characterizing this *T. gondii* diversity will be one of the challenges in the coming years. Nevertheless, with this work, we point to the environmental differences potentially explaining the diversity observed in Benin, Senegal and Gabon.

Previous studies made it clear that port areas and human mediated activities seem to play a crucial role in shaping the epidemiology for a large number of zoonotic diseases such as toxoplasmosis [4,12,22]. These issues raise health challenges for the future in our globalized trading world. In this context, it remains important to continue studying *T. gondii* genetic diversity in the world and especially in Africa where data is still fragmented, particularly concerning the clinical aspects of toxoplasmosis in relation to its genetic diversity.

Acknowledgments

We would like to thank Florent Engelmann, the director of the Institut de Recherche pour le Développement (IRD) de Cotonou and its staff for their collaboration on the field mission in Benin. We also thank Dorothée Kindé-Gazard for allowing use to use her laboratory for the isolation protocol at the Faculté des Sciences de la Santé in Cotonou, and Melkior Kouchade, superior officer of Water, Forests and Hunting and Nagoya focal point in Benin for meeting and helping us build the Protocol on Access and Benefit sharing. Finally, yet importantly, we are incredibly grateful to the poultry owners in Benin for accepting to participate to this study.

Author contribution

Conceptualization: Azra Hamidović, Lokman Galal, Marie-Laure Dardé, Aurélien Mercier

Data curation: Azra Hamidović, Lokman Galal, Marie-Laure Dardé, Aurélien Mercier

Formal analysis: Azra Hamidović, Lokman Galal, Aurélien Mercier

Funding acquisition: Lokman Galal, Aurélien Mercier

Investigation: Azra Hamidović, Jonas Raoul Etougbetche, Arétas Babatounde Nounnagnon Tonouhewa, Richard Amagbégnon, Honoré Da Zoclanclounon, Aurélien Mercier

Methodology : Azra Hamidović, Sylvain Piry, Karine Berthier, Marie-Laure Dardé, Aurélien Mercier

Project administration : Aurélien Mercier

Resources : Hilda Fátima Jesus Pena, Marie-Laure Dardé

Software : Azra Hamidović, Lokman Galal, Sylvain Piry, Karine Berthier

Supervision : Gauthier Dobigny, Gualbert Houémènou, Anatole Laleye, Nadine Fievet, Marie-Laure Dardé, Aurélien Mercier

Validation : Azra Hamidović, Lokman Galal, Marie-Laure Dardé, Aurélien Mercier, Gauthier Dobigny, Sylvain Piry, Karine Berthier, Hilda Fátima Jesus Pena, Jonas Raoul Etougbétché

Vizualization : Azra Hamidović, Lokman Galal, Marie-Laure Dardé, Aurélien Mercier

Writing – original draft : Azra Hamidović, Lokman Galal, Marie-Laure Dardé, Aurélien Mercier

Writing – review & editing : Azra Hamidović, Lokman Galal, Marie-Laure Dardé, Aurélien Mercier, Gauthier Dobigny, Sylvain Piry, Hilda Fátima Jesus Pena, Jonas Raoul Etougbétché

Supporting information

S1 Table. Genotyping results of every *Toxoplasma gondii* strains from Benin, and strains from Gabon, Senegal and Brazil, in addition to reference strains (FOU, NED, PRU) (XLSX)

Strain ID	BRC <i>Toxoplasma</i> ID	Species	Country	City (only for this study)	Reference	Inoculum doses (estimation number of parasite)	Genotype	TUB2	W35	TgM-A	B18	B17	M33	M- IV1	M-X11	M48	M102	N60	N82	AA	N61	N83
PRU	TgH00001		REF				Type II	289	242	207	158	336	169	274	356	209	176	142	117	265	127	310
NED	TgH00003		REF				Type III	289	242	205	160	336	165	278	356	209	190	147	111	267	91	312
FOU	TgH00007		REF				Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	227	166	147	111	281	89	306
P19S1AJ6	TgA119002	<i>G. dom</i>	Benin	Cotonou	this study	21	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	227	166	147	111	267	89	306
P61S3AJ6	TgA119006	<i>G. dom</i>	Benin	Cotonou	this study	60	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	233	166	147	111	271	89	306
P63S1AJ6	TgA119005	<i>G. dom</i>	Benin	Cotonou	this study	7	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	239	166	149	111	269	91	306
P82S1AJ6	TgA119004	<i>G. dom</i>	Benin	Cotonou	this study	12	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	233	166	147	109	267	89	306
P84S2AJ12	TgA119007	<i>G. dom</i>	Benin	Cotonou	this study	26	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	233	166	147	111	269	91	306
P94S1AJ6	TgA119008	<i>G. dom</i>	Benin	Cotonou	this study	5	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	227	166	147	111	271	89	306
P95S2AJ10	TgA119009	<i>G. dom</i>	Benin	Cotonou	this study	8	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	227	166	147	111	271	89	306
P730S2AJ7	TgA119010	<i>G. dom</i>	Benin	Cotonou	this study	18	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	235	166	145	111	271	95	304
P731S1AJ7	TgA119011	<i>G. dom</i>	Benin	Cotonou	this study	12	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	225	166	147	111	277	91	306
P739S1AJ7	TgA119012	<i>G. dom</i>	Benin	Cotonou	this study	7	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	229	166	147	111	271	89	306
P747S2AJ9	TgA119013	<i>G. dom</i>	Benin	Cotonou	this study	12	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	235	166	147	111	271	87	304
P755S1AJ6	TgA119014	<i>G. dom</i>	Benin	Cotonou	this study	99	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	243	166	147	111	275	91	306
P112S1CJ26	TgA119015	<i>G. dom</i>	Benin	Ouidah	this study	18	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	231	166	145	113	267	91	308
P141S1AJ10	TgA119016	<i>G. dom</i>	Benin	Ouidah	this study	12	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	225	166	147	111	269	87	306
P147S2AJ14	TgA119017	<i>G. dom</i>	Benin	Ouidah	this study	7	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	235	166	147	111	273	89	306
P162S2AJ14	TgA119018	<i>G. dom</i>	Benin	Ouidah	this study	82	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	225	166	147	111	269	87	306
P170S1AJ9	TgA119019	<i>G. dom</i>	Benin	Ouidah	this study	68	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	225	166	147	111	269	87	306
P177S1AJ16	TgA119020	<i>G. dom</i>	Benin	Ouidah	this study	374	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	231	166	151	111	271	91	306
P205S3AJ9	TgA119021	<i>G. dom</i>	Benin	Ouidah	this study	20	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	231	166	151	111	271	91	306
P219S1AJ11	TgA119022	<i>G. dom</i>	Benin	Ouidah	this study	83	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	225	166	147	111	273	89	306
P228S1AJ11	TgA119023	<i>G. dom</i>	Benin	Ouidah	this study	4	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	225	166	147	111	275	89	306
P239S2AJ8	TgA119024	<i>G. dom</i>	Benin	Ouidah	this study	6	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	231	166	147	109	267	89	306
P249S2CJ23	TgA119025	<i>G. dom</i>	Benin	Ouidah	this study	19	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	223	166	147	111	275	89	306
P328S1AJ18	TgA119026	<i>G. dom</i>	Benin	Parakou	this study	16	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	241	166	149	111	273	89	304
P332S2AJ14	TgA119027	<i>G. dom</i>	Benin	Parakou	this study	53	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	227	166	149	111	271	87	306

P339S2AJ19	TgA119028	<i>G. dom</i>	Benin	Parakou	this study	133	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	227	166	149	111	271	87	306
P354S1AJ13	TgA119029	<i>G. dom</i>	Benin	Parakou	this study	21	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	227	166	149	111	271	87	306
P418S1AJ17	TgA119030	<i>G. dom</i>	Benin	Parakou	this study	33	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	231	166	147	111	269	89	306
P421S1AJ10	TgA119031	<i>G. dom</i>	Benin	Parakou	this study	562	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	221	166	151	111	271	89	306
P470S1AJ14	TgA119032	<i>G. dom</i>	Benin	Parakou	this study	135	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	229	166	147	111	269	89	306
P588S1AJ20	TgA119033	<i>G. dom</i>	Benin	Natitingou	this study	5	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	219	166	147	111	271	89	304
P608S2AJ9	TgA119034	<i>A. platy</i>	Benin	Natitingou	this study	151	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	231	166	147	111	273	89	306
P626S3AJ11	TgA119035	<i>G. dom</i>	Benin	Natitingou	this study	14	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	229	166	147	111	271	89	308
P627S2AJ13	TgA119036	<i>G. dom</i>	Benin	Natitingou	this study	8	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	229	166	147	111	271	89	308
P637S1AJ14	TgA119001	<i>G. dom</i>	Benin	Natitingou	this study		Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	229	166	147	111	271	89	308
P656S1AJ14	TgA119037	<i>G. dom</i>	Benin	Natitingou	this study		Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	229	166	147	111	271	89	308
GAB3-2007-GAL-DOM001	TgA105041		Gabon		Mercier et al. 2010		Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	223	166	147	111	269	89	306
GAB3-2007-GAL-DOM002	TgA105001		Gabon		Mercier et al. 2010		Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	223	166	147	111	269	89	306
GAB3-2007-GAL-DOM003	TgA105048		Gabon		Mercier et al. 2010		Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	223	166	147	111	269	89	306
GAB3-2007-GAL-DOM011	TgA105043		Gabon		Mercier et al. 2010		Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	223	166	147	111	273	87	304
GAB3-2007-GAL-DOM014	TgA105046		Gabon		Mercier et al. 2010		Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	229	166	142	111	271	95	306
GAB5-2007-GAL-DOM001	TgA105002		Gabon		Mercier et al. 2010		Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	231	166	149	111	277	87	306
GAB5-2007-GAL-DOM002	TgA105054		Gabon		Mercier et al. 2010		Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	231	166	149	111	275	87	306
GAB6-2007-GAL-DOM019	TgA105024		Gabon		Mercier et al. 2010		Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	223	166	147	111	273	89	306
180127Cmos02	TgA117065		Senegal		Galal et al. 2019		Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	233	166	147	111	269	89	306
180127Gdom01	TgA117063		Senegal		Galal et al. 2019		Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	231	166	147	111	271	87	306
180128Gdom04	TgA117064		Senegal		Galal et al. 2019		Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	233	166	147	111	269	89	306
180129Pbic09	TgA117013		Sénégal		Galal et al. 2019		Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	233	166	147	111	269	89	306
180317Gdom14	TgA117066		Senegal		Galal et al. 2019		Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	227	166	149	111	275	91	306
180317Gdom20	TgA117010		Senegal		Galal et al. 2019		Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	233	166	147	111	281	89	310
180322Gdom17	TgA117008		Senegal		Galal et al. 2019		Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	227	166	147	111	271	89	306
TgCgamb02			Senegal		Galal et al. 2019		Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	229	166	145	111	269	85	306
TgColiv01			Senegal		Galal et al. 2019		Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	231	166	147	111	273	89	306
160428Gdom06	TgA117020		Senegal		Galal et al. 2019		Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	235	166	145	111	269	89	306
160628Gdom17	TgA117052		Senegal		Galal et al. 2019		Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	225	166	147	111	269	89	304

160816Gdom06		Senegal	Galal et al. 2019	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	233	166	147	111	269	89	306
160816Gdom37	TgA117059	Senegal	Galal et al. 2019	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	231	166	147	111	271	89	306
160816Nmel01		Senegal	Galal et al. 2019	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	235	164	149	111	273	89	306
160817Gdom23	TgA117006	Senegal	Galal et al. 2019	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	231	166	144	111	279	89	308
BRA-TgCatBr42		Brazil	Pena et al. 2008-RFLP	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	229	166	147	111	273	89	308
BRA-TgCatBr50		Brazil	Pena et al. 2008-RFLP	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	231	166	147	111	265	89	310
BRA-TgCatBr62		Brazil	Pena et al. 2008-RFLP	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	225	166	145	111	265	89	310
BRA-TgCatBr71		Brazil	Pena et al. 2008-RFLP	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	233	166	149	111	271	89	308
BRA-TgCatBr75		Brazil	Pena et al. 2008-RFLP	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	235	166	147	111	271	87	306
BRA-TgCkBr004 (CK202)		Brazil	this study	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	227	166	147	111	271	89	308
BRA-TgCkBr010 (CK216)		Brazil	Dubey et al. 2008-RFLP	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	227	166	147	111	271	89	308
BRA-TgCkBr015 (CK198)		Brazil	this study	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	227	166	147	111	271	89	308
BRA-TgCkBr055 (CK343)		Brazil	Dubey et al. 2008-RFLP	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	237	166	145	113	275	89	308
BRA-TgCkBr086 (CK340)		Brazil	Dubey et al. 2008-RFLP	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	225	166	145	111	269	89	308
BRA-TgCkBrHp203		Brazil	Soares et al. 2011-RFLP	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	233	166	147	111	283	91	308
BRA-TgCkBrHp207		Brazil	Soares et al. 2011-RFLP	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	233	166	147	111	283	91	308
BRA-TgCkBrHp265		Brazil	Pena et al. 2013-dna extraction/RFLP	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	231	166	153	113	273	89	306
BRA-TgCkBrHp273		Brazil	Pena et al. 2013-dna extraction/RFLP	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	233	166	142	111	279	89	306
BRA-TgCkBrHp277		Brazil	Pena et al. 2013-dna extraction/RFLP	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	235	166	147	111	271	89	306
BRA-TgCkBrHp281		Brazil	Pena et al. 2013-dna extraction/RFLP	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	233	166	145	111	267	89	306
BRA-TgCpBrHp14		Brazil	Yai et al. 2009-dna extraction/RFLP	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	233	166	147	111	267	89	308
BRA-TgDgBrHp20		Brazil	this study	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	239	166	147	111	269	85	308
BRA-TgGtBrHp002		Brazil	Ragozo et al. 2010-dna extraction/RFLP	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	227	166	149	109	269	91	308
BRA-TgGtBrHp003		Brazil	Ragozo et al. 2010-dna extraction/RFLP	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	227	166	149	109	269	91	308
BRA-TgGtBrHp004		Brazil	Ragozo et al. 2010-dna extraction/RFLP	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	227	166	149	109	269	91	308
BRA-TgGtBrHp009		Brazil	Ragozo et al. 2010-dna extraction/RFLP	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	227	166	149	109	269	91	308
BRA-TgShBrHp08		Brazil	Ragozo et al. 2010-dna extraction/RFLP	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	233	166	147	111	277	91	308
BRA-TgShBrHp09		Brazil	Ragozo et al. 2010-dna extraction/RFLP	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	233	166	147	111	277	91	308
BRA-TgShBrHp10		Brazil	Ragozo et al. 2010-dna extraction/RFLP	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	231	166	147	111	273	89	308
BRA-TgShBrHp11		Brazil	Ragozo et al. 2010-dna extraction/RFLP	Africa 1	291	248	205	160	342	165	274	354	229	166	149	111	271	89	318

TgCgamb03		Senegal		Galal et al. 2019b	Africa 4	291	242	203	156	336	165	274	354	223	174	130	109	299	99	310	
160503Gdom10	TgA117021	Senegal		Galal et al. 2019	Africa 4	291	242	203	156	336	165	274	354	223	174	130	109	301	99	310	
160530Cmos12	TgA117032	Senegal		Galal et al. 2019	Africa 4	291	242	203	156	336	165	274	354	223	174	130	109	312	99	310	
160615Gdom17	TgA117040	Senegal		Galal et al. 2019	Africa 4	291	242	203	156	336	165	274	354	223	174	130	109	305	101	310	
160627Gdom23		Senegal		Galal et al. 2019	Africa 4	291	242	203	156	336	165	274	354	225	174	130	109	304	99	310	
160817Gdom03		Senegal		Galal et al. 2019	Africa 4	291	242	203	156	336	165	274	354	221	174	130	109	310	105	310	
160817Cmos02	TgA117060	Senegal		Galal et al. 2019	Africa 4	291	242	203	156	336	165	274	354	219	174	130	109	310	95	310	
160504Fcat01	TgA117007	Senegal		Galal et al. 2019	Africa 4	293	242	203	156	336	165	274	354	217	174	130	109	281	101	306	
P676		<i>G. dom</i>	Benin	Natitingou (Bokoumbé)	this study	Africa 4	293	242	203	156	336	165	274	354	215	174	129	109	291	107	306
GAB12007GALDO M005	TgA105028		Gabon		Mercier et al. 2010	Type III	289	242	205	160	336	165	278	356	213	190	145	111	271	89	312
GAB12007OVIARIO 04	TgA105068		Gabon		Mercier et al. 2010	Type III	289	242	205	160	336	165	278	356	213	190	145	111	273	89	312
GAB1CAPAEG001	TgA105007		Gabon		Mercier et al. 2010	Type III	289	242	205	160	336	165	278	356	213	190	147	111	273	87	312
GAB1CAPAEG002	TgA105008		Gabon		Mercier et al. 2010	Type III	289	242	205	160	336	165	278	356	211	190	147	111	267	85	312
GAB1FELCAT001	TgA105034		Gabon		Mercier et al. 2010	Type III	289	242	205	160	336	165	278	356	213	190	149	111	267	89	312
GAB3GALDOM013	TgA105045		Gabon		Mercier et al. 2010	Type III	289	242	205	160	336	165	278	356	213	190	147	111	265	87	314
GAB7GALDOM007	TgA105057		Gabon		Mercier et al. 2010	Type III	289	242	205	160	336	165	278	356	213	190	147	111	275	89	312
160421Gdom18		Senegal		Galal et al., 2019	Type III	289	242	205	160	336	165	278	356	209	188	151	111	275	91	312	
160511Gdom06	TgA117024	Senegal		Galal et al., 2019	Type III	289	242	205	160	336	165	278	356	209	188	153	111	267	89	312	
160615Gdom14	TgA117038	Senegal		Galal et al., 2019	Type III	289	242	205	160	336	165	278	356	213	190	149	111	267	91	312	
160623Gdom19	TgA117046	Senegal		Galal et al., 2019	Type III	289	242	205	160	336	165	278	356	209	192	153	111	269	89	312	
160823Gdom04	TgA117062	Senegal		Galal et al., 2019	Type III	289	242	205	160	336	165	278	356	209	190	149	111	273	89	312	
P191S2CJ28	TgA119038	<i>G. dom</i>	Benin	Ouidah	this study	Type III	289	242	205	160	336	165	278	356	213	190	151	111	265	89	312
P193S1CJ28	TgA119003	<i>G. dom</i>	Benin	Ouidah	this study	Type III	289	242	205	160	336	165	278	356	213	190	151	111	265	89	312
GAB22007GALDO M006	TgA105040		Gabon		Mercier et al. 2010	Type III	289	242	205	160	336	165	278	356	223	190	147	111	261	103	316
GAB12007CAPAE G004	TgA105033		Gabon		Mercier et al. 2010	Type III	291	242	205	160	336	165	278	356	211	190	147	111	267	85	312
GAB42007GALDO M001	TgA105053		Gabon		Mercier et al. 2010	Type III	291	242	205	160	336	165	278	356	213	190	145	111	269	89	306

References

- Dubey JP, Velmurugan GV, Chockalingam A, Pena HFJ, de Oliveira LN, Leifer CA, et al. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Brazil. *Vet Parasitol* 2008;157:299–305. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.07.036>.
- Galal L, Schares G, Stragier C, Vignoles P, Brouat C, Cuny T, et al. Diversity of *Toxoplasma gondii* strains shaped by commensal communities of small mammals. *Int J Parasitol* 2019;49:267–75. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.11.004>
- Galal L, Sarr A, Cuny T, Brouat C, Coulibaly F, Sembène M, et al. The introduction of new hosts with human trade shapes the extant distribution of *Toxoplasma gondii* lineages. *PLOS Negl Trop Dis* 2019b;13:e0007435. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007435>.
- Mercier A, Devillard S, Ngoubangoye B, Bonnabau H, Bañuls A-L, Durand P, et al. Additional Haplogroups of *Toxoplasma gondii* out of Africa: Population Structure and Mouse-Virulence of Strains from Gabon. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2010;4:e876.
- Pena HFJ, Gennari SM, Dubey JP, Su C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *International Journal for Parasitology* 2008;38:561–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.09.004>.
- Pena HFJ, Vitaliano SN, Beltrame MAV, Pereira FEL, Gennari SM, Soares RM. PCR-RFLP genotyping of *Toxoplasma gondii* from chickens from Espírito Santo state, Southeast region, Brazil: New genotypes and a new SAG3 marker allele. *Veterinary Parasitology* 2013;192:111–7. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.10.004>.
- Pena HFJ, Moroz LR, Sozigan RKB, Ajzenberg D, Carvalho FR, Mota CM, et al. Isolation and Biological and Molecular Characterization of *Toxoplasma gondii* from Canine Cutaneous Toxoplasmosis in Brazil. *J Clin Microbiol* 2014;52:4419–20. <https://doi.org/10.1128/JCM.02001-14>.
- Ragozo AMA, Pena HFJ, Yai LEO, Su C, Gennari SM. Genetic diversity among *Toxoplasma gondii* isolates of small ruminants from Brazil: Novel genotypes revealed. *Veterinary Parasitology* 2010;170:307–12. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.02.024>.
- Soares RM, Silveira LH, da Silva AV, Ragozo A, Galli S, Lopes EG, et al. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates from free range chickens in the Pantanal area of Brazil. *Veterinary Parasitology* 2011;178:29–34. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.12.037>.
- Yai LEO, Ragozo AMA, Soares RM, Pena HFJ, Su C, Gennari SM. Genetic diversity among capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) isolates of *Toxoplasma gondii* from Brazil. *Veterinary Parasitology* 2009;162:332–7. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.03.007>.

References

- [1] Frenkel JK. *Toxoplasma gondii* in Cats: Fecal Stages Identified as Coccidian Oocysts 1970.
- [2] Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clinical Microbiology and Infection* 2002;8:634–640.
- [3] Dubey JP, Beattie CP. *Toxoplasmosis of animals and man*. CRC Press, Inc.; 1988.
- [4] Galal L, Sarr A, Cuny T, Brouat C, Coulibaly F, Sembène M, et al. The introduction of new hosts with human trade shapes the extant distribution of *Toxoplasma gondii* lineages. *PLOS Negl Trop Dis* 2019;13:e0007435. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007435>.
- [5] Ajzenberg D. Unresolved questions about the most successful known parasite. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 2011;9:169–71. <https://doi.org/10.1586/eri.10.169>.
- [6] Lewden C, Drabo YJ, Zannou DM, Maiga MY, Minta DK, Sow PS, et al. Disease patterns and causes of death of hospitalized HIV-positive adults in West Africa: a multicountry survey in the antiretroviral treatment era. *Journal of the International AIDS Society* 2014;17:18797. <https://doi.org/10.7448/IAS.17.1.18797>.
- [7] Carme B, Bissuel F, Ajzenberg D, Bouyne R, Aznar C, Demar M, et al. Severe Acquired Toxoplasmosis in Immunocompetent Adult Patients in French Guiana. *Journal of Clinical Microbiology* 2002;40:4037–44. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.11.4037-4044.2002>.
- [8] Carme B, Demar M, Ajzenberg D, Dardé ML. Severe Acquired Toxoplasmosis Caused by Wild Cycle of *Toxoplasma gondii*, French Guiana. *Emerg Infect Dis* 2009;15:656–8. <https://doi.org/10.3201/eid1504.081306>.
- [9] Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology* 2000;30:1217–1258.
- [10] Robert-Gangneux F, Darde M-L. Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. *Clinical Microbiology Reviews* 2012;25:264–96. <https://doi.org/10.1128/CMR.05013-11>.
- [11] Mercier A, Devillard S, Ngoubangoye B, Bonnabau H, Bañuls A-L, Durand P, et al. Additional Haplogroups of *Toxoplasma gondii* out of Africa: Population Structure and Mouse-Virulence of Strains from Gabon. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2010;4:e876. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000876>.
- [12] Mercier A, Ajzenberg D, Devillard S, Demar MP, De Thoisy B, Bonnabau H, et al. Human impact on genetic diversity of *Toxoplasma gondii*: example of the anthropized environment from French Guiana. *Infection, Genetics and Evolution* 2011;11:1378–1387.
- [13] Galal L, Ajzenberg D, Hamidović A, Durieux M-F, Dardé M-L, Mercier A. *Toxoplasma* and Africa: One Parasite, Two Opposite Population Structures. *Trends in Parasitology* 2018;34:140–54. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.10.010>.
- [14] Galal L, Schares G, Stragier C, Vignoles P, Brouat C, Cuny T, et al. Diversity of *Toxoplasma gondii* strains shaped by commensal communities of small mammals. *Int J Parasitol* 2019;49:267–75. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.11.004>.
- [15] Abu EK, Boampong JN, Amoabeng JK, Ilechie AA, Kyei S, Owusu-Ansah A, et al. Epidemiology of Ocular Toxoplasmosis in Three Community Surveys in the Central Region of Ghana, West Africa. *Ophthalmic Epidemiology* 2016;23:14–9. <https://doi.org/10.3109/09286586.2015.1089579>.

- [16] Leroy J, Houzé S, Dardé M-L, Yéra H, Rossi B, Delhaes L, et al. Severe toxoplasmosis imported from tropical Africa in immunocompetent patients: A case series. *Travel Medicine and Infectious Disease* 2019;101509. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2019.101509>.
- [17] Etougbétché J, Houémènou G, Dossou H-J, Badou S, Gauthier P, Karim IYA, et al. Genetic diversity and origins of invasive black rats (*Rattus rattus*) in Benin, West Africa. *Fozo1* 2020;69:1–11. <https://doi.org/10.25225/jvb.20014>.
- [18] Ellis AB. Yoruba-Speaking Peoples of the Slave Coast of West Africa 1864:158.
- [19] Richardson D, Eltis D. Atlas of the Transatlantic Slave Trade. Lewis Walpole Series in Eighteenth-Century Culture and History 2015.
- [20] Lovejoy PE. Transformations in Slavery: A History of Slavery in Africa. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2011. <https://doi.org/10.1017/CBO9781139014946>.
- [21] Rifkin RF, Vikram S, Ramond J-BJ, Cowan DA, Jakobsson M, Schlebusch CM, et al. Ancient DNA of *Rickettsia felis* and *Toxoplasma gondii* implicated in the death of a hunter-gatherer boy from South Africa, 2,000 years ago. *Molecular Biology*; 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.07.23.217141>.
- [22] Galal L, Hamidović A, Dardé ML, Mercier M. Diversity of *Toxoplasma gondii* strains at the global level and its determinants. *Food and Waterborne Parasitology* 2019;15:e00052. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2019.e00052>.
- [23] Konečný A, Estoup A, Duplantier J-M, Bryja J, Bâ K, Galan M, et al. Invasion genetics of the introduced black rat (*Rattus rattus*) in Senegal, West Africa. *Molecular Ecology* 2013;22:286–300. <https://doi.org/10.1111/mec.12112>.
- [24] Dalecky A, Bâ K, Piry S, Lippens C, Diagne CA, Kane M, et al. Range expansion of the invasive house mouse *Mus musculus domesticus* in Senegal, West Africa: a synthesis of trapping data over three decades, 1983-2014: Range expansion of the house mouse in Senegal. *Mammal Review* 2015;45:176–90. <https://doi.org/10.1111/mam.12043>.
- [25] Hima K, Houémènou G, Badou S, Garba M, Dossou H-J, Etougbétché J, et al. Native and Invasive Small Mammals in Urban Habitats along the Commercial Axis Connecting Benin and Niger, West Africa. *Diversity* 2019;11:238. <https://doi.org/10.3390/d11120238>.
- [26] Desmonts G, Remington JS. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. *Journal of Clinical Microbiology* 1980;11:562–568.
- [27] Bolais PF, Vignoles P, Pereira PF, Keim R, Aroussi A, Ismail K, et al. *Toxoplasma gondii* survey in cats from two environments of the city of Rio de Janeiro, Brazil by Modified Agglutination Test on sera and filter-paper. *Parasites Vectors* 2017;10:88. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2017-8>.
- [28] Ajzenberg D, Collinet F, Mercier A, Vignoles P, Dardé M-L. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates with 15 microsatellite markers in a single multiplex PCR assay. *J Clin Microbiol* 2010;48:4641–5. <https://doi.org/10.1128/JCM.01152-10>.
- [29] Dubey JP, Velmurugan GV, Chockalingam A, Pena HFJ, de Oliveira LN, Leifer CA, et al. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Brazil. *Vet Parasitol* 2008;157:299–305. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.07.036>.
- [30] Pena HFJ, Gennari SM, Dubey JP, Su C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *International Journal for Parasitology* 2008;38:561–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.09.004>.

- [31] Yai LEO, Ragozo AMA, Soares RM, Pena HFJ, Su C, Gennari SM. Genetic diversity among capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) isolates of *Toxoplasma gondii* from Brazil. *Veterinary Parasitology* 2009;162:332–7. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.03.007>.
- [32] Soares RM, Silveira LH, da Silva AV, Ragozo A, Galli S, Lopes EG, et al. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates from free range chickens in the Pantanal area of Brazil. *Veterinary Parasitology* 2011;178:29–34. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.12.037>.
- [33] Ragozo AMA, Pena HFJ, Yai LEO, Su C, Gennari SM. Genetic diversity among *Toxoplasma gondii* isolates of small ruminants from Brazil: Novel genotypes revealed. *Veterinary Parasitology* 2010;170:307–12. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.02.024>.
- [34] Pena HFJ, Vitaliano SN, Beltrame MAV, Pereira FEL, Gennari SM, Soares RM. PCR-RFLP genotyping of *Toxoplasma gondii* from chickens from Espírito Santo state, Southeast region, Brazil: New genotypes and a new SAG3 marker allele. *Veterinary Parasitology* 2013;192:111–7. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.10.004>.
- [35] Pena HFJ, Moroz LR, Sozigan RKB, Ajzenberg D, Carvalho FR, Mota CM, et al. Isolation and Biological and Molecular Characterization of *Toxoplasma gondii* from Canine Cutaneous Toxoplasmosis in Brazil. *J Clin Microbiol* 2014;52:4419–20. <https://doi.org/10.1128/JCM.02001-14>.
- [36] Bruvo R, Michiels NK, D’Souza TG, Schulenburg H. A simple method for the calculation of microsatellite genotype distances irrespective of ploidy level. *Mol Ecol* 2004;13:2101–6. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02209.x>.
- [37] Law R. Ouidah: The Social History of a West African Slaving “port” 1727-1892. Ohio State University Press; 2004.
- [38] Jiang T, Shwab EK, Martin RM, Gerhold RW, Rosenthal BM, Dubey JP, et al. A partition of *Toxoplasma gondii* genotypes across spatial gradients and among host species, and decreased parasite diversity towards areas of human settlement in North America. *International Journal for Parasitology* 2018;48:611–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.01.008>.
- [39] Su C, Khan A, Zhou P, Majumdar D, Ajzenberg D, Dardé M-L, et al. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2012;109:5844–5849.
- [40] El Behairy AM, Choudhary S, Ferreira LR, Kwok OCH, Hilali M, Su C, et al. Genetic characterization of viable *Toxoplasma gondii* isolates from stray dogs from Giza, Egypt. *Veterinary Parasitology* 2013;193:25–9. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.007>.
- [41] Jokelainen P, Murat J-B, Nielsen HV. Direct genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from clinical samples from Denmark: not only genotypes II and III. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2018;37:579–86. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-3152-z>.
- [42] Beck HE, Zimmermann NE, McVicar TR, Vergopolan N, Berg A, Wood EF. Present and future Köppen-Geiger climate classification maps at 1-km resolution. *Scientific Data* 2018;5:180214. <https://doi.org/10.1038/sdata.2018.214>.
- [43] Dunn RR, Davies TJ, Harris NC, Gavin MC. Global drivers of human pathogen richness and prevalence. *Proc Biol Sci* 2010;277:2587–95. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.0340>.
- [44] Hochberg, Gomulkiewicz, Holt, Thompson. Weak sinks could cradle mutualistic symbioses – strong sources should harbour parasitic symbioses. *Journal of Evolutionary Biology* 2000;13:213–22. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2000.00157.x>.

- [45] Shwab EK, Saraf P, Zhu X-Q, Zhou D-H, McFerrin BM, Ajzenberg D, et al. Human impact on the diversity and virulence of the ubiquitous zoonotic parasite *Toxoplasma gondii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018;115:E6956–63. <https://doi.org/10.1073/pnas.1722202115>.
- [46] Hassan MA, Olijnik A-A, Frickel E-M, Saeij JP. Clonal and atypical *Toxoplasma* strain differences in virulence vary with mouse sub-species. *Int J Parasitol* 2019;49:63–70. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.08.007>.
- [47] Lippens C, Estoup A, Hima MK, Loiseau A, Tatard C, Dalecky A, et al. Genetic structure and invasion history of the house mouse (*Mus musculus domesticus*) in Senegal, West Africa: a legacy of colonial and contemporary times. *Heredity (Edinb)* 2017;119:64–75. <https://doi.org/10.1038/hdy.2017.18>.
- [48] Mombo IM, Suquet E, Boundenga L, Mveang-Nzoghe A, Maganga-Mboga C, Arnathau C, et al. Detection of novel astroviruses among rodents of Gabon, Central Africa. *Infection, Genetics and Evolution* 2019;68:43–6. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.12.003>.
- [49] Fujii H, Kamiyama T, Hagiwara T. Species and strain differences in sensitivity to *Toxoplasma* infection among laboratory rodents. *Jpn J Med Sci Biol* 1983;36:343–6. <https://doi.org/10.7883/yoken1952.36.343>.
- [50] Khan A, Taylor S, Ajioka JW, Rosenthal BM, Sibley LD. Selection at a Single Locus Leads to Widespread Expansion of *Toxoplasma gondii* Lineages That Are Virulent in Mice. *PLOS Genet* 2009;5. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000404>.
- [51] Dubey JP, Ferreira LR, Alsaad M, Verma SK, Alves DA, Holland GN, et al. Experimental Toxoplasmosis in Rats Induced Orally with Eleven Strains of *Toxoplasma gondii* of Seven Genotypes: Tissue Tropism, Tissue Cyst Size, Neural Lesions, Tissue Cyst Rupture without Reactivation, and Ocular Lesions. *PLOS ONE* 2016;11:e0156255. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156255>.
- [52] Jensen KDC, Camejo A, Melo MB, Cordeiro C, Julien L, Grotenbreg GM, et al. *Toxoplasma gondii* Superinfection and Virulence during Secondary Infection Correlate with the Exact ROP5/ROP18 Allelic Combination. *MBio* 2015;6:e02280-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.02280-14>.
- [53] Lilue J, Müller UB, Steinfeldt T, Howard JC. Reciprocal virulence and resistance polymorphism in the relationship between *Toxoplasma gondii* and the house mouse. *ELife* 2013;2:e01298. <https://doi.org/10.7554/eLife.01298>.
- [54] Su C, Zhang X, Dubey JP. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites. *Int J Parasitol* 2006;36:841–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.03.003>.
- [55] Lorenzi H, Khan A, Behnke MS, Namasivayam S, Swapna LS, Hadjithomas M, et al. Local admixture of amplified and diversified secreted pathogenesis determinants shapes mosaic *Toxoplasma gondii* genomes. *Nature Communications* 2016;7:10147. <https://doi.org/10.1038/ncomms10147>.

II.4. Données supplémentaires

Des analyses supplémentaires avec les mêmes tests ont été réalisées en mode exploratoire avant cette étude sur tous les génotypes animaux en Afrique communs avec les génotypes présents au Bénin en plus de l’Africa 1: le Type III et l’Africa 4 (Annexes 2 et 3). Comparé à l’Africa 1, le nombre de génotypes Type III et Africa 4 différents décrits est bien plus faible : 24 génotypes pour le Type III et 10 génotypes pour l’Africa 4. Les génotypes utilisés pour réaliser ces analyses sont issus d’une base de données de l’UMR Inserm 1094 et la plupart des échantillons ne sont pas publiés. Pour le Type III, des génotypes de La Réunion, du Bénin, Sénégal, Gabon, Tunisie, Ethiopie et Ghana ont été inclus. Pour l’Africa 4, lignée très récemment décrite, seuls des génotypes du Bénin, du Sénégal et de la Tunisie ont pu être inclus. Les mêmes conclusions ont été observées pour l’Africa 4 comme pour le Type III : il n’y a pas de structure potentielle au sein de ces lignées à l’heure actuelle. Mais il se pourrait que le faible échantillonnage ou l’utilisation de marqueurs microsatellites ne permettent pas d’en déceler.

De plus, les données de sérologie engendrées par notre protocole seront utilisées dans une étude de prévalence comprenant plus d’animaux de rente au Bénin par Arétas B. N. Tonouhewa, un vétérinaire et collaborateur béninois.

Chapitre III. Etude de la prévalence moléculaire de *Toxoplasma gondii* chez des rongeurs et autres micromammifères du Bénin

III.1. Introduction

Les rongeurs et autres micromammifères ont un intérêt épidémiologique important dans le cycle de transmission de *T. gondii* car en tant que proies privilégiées des hôtes définitifs, les félinés : ils permettent la propagation de souches du toxoplasme dont ils sont réservoirs dans l'environnement. Les études s'intéressant à la prévalence de la toxoplasmose chez ces hôtes montrent une grande variabilité selon la région et l'espèce étudiées. Les rares études sont essentiellement basées sur la séroprévalence. Les résultats indiquaient par exemple des séroprévalences de 2,3% chez *Rattus rattus* au Gabon en milieu rural (Mercier et al., 2010), entre 26,7 et 34% chez *Rattus norvegicus* en Egypte, 1,6% chez *Mus musculus* à Niamey au Niger (Mercier et al., 2013, supplementary table) ou encore 4,2% chez un échantillonnage de 1205 rongeurs au Sénégal (Brouat et al., 2018). Mais ces travaux de séroprévalence sur rongeurs sauvages sont aujourd'hui remis en cause pour certaines espèces du fait de discordances entre la sérologie et la détection d'ADN, ce qui amène à utiliser la PCR comme gold-standard (Galal et al., 2019c).

En laboratoire, ces hôtes (et plus particulièrement la souris de laboratoire dérivée de la souris domestique) sont largement utilisés pour étudier la toxoplasmose, que ce soit sur le plan de la réponse immunitaire des hôtes, de la virulence ou/et de la génétique du parasite. Historiquement, le classement des premiers isolats en Types I, II et III était purement en lien avec la virulence des souches chez la souris de laboratoire (Sibley et Boothroyd, 1992). Mais cette virulence chez cette dernière est-elle extrapolable à toutes les espèces, notamment sauvages ? La réponse est évidemment non. De grandes variabilités dans la virulence ont été observées lorsque l'on change de modèle (Ferreira et al., 2001; Lilue et al., 2013; Hassan et al., 2019), ce qui démontre la difficulté de faire des généralités au sein même de différentes lignées d'une même espèce. Grossièrement, nous pouvons opposer deux groupes : les « gros » rongeurs comme les rats (*R. rattus*, *R. norvegicus* etc.) et les « petits » rongeurs comme les souris (*Mus spp.*). Par exemple, les souris sont très sensibles à la souche RH (Type I) alors que les rats semblent y être résistants (Fujii et al., 1983). D'ailleurs, cette sensibilité serait en lien avec la distribution de la diversité génétique de *T. gondii* dans le monde. Il a été montré au Sénégal que l'introduction d'espèces invasives a amené à une inversion de l'équilibre rongeur autochtone/invasif sur certaines parties du territoire sénégalais en lien avec notamment le développement des réseaux routiers (Dalecky et al., 2015). Ainsi le Type II aurait pu s'implanter sur la côte sénégalaise grâce à l'introduction de la souris au dépend des espèces autochtones telles que *Mastomys sp.* qui seraient résistantes à certains

génotypes autochtones comme l’Africa 1 pourtant virulent chez la souris domestique (Galal et al., 2019).

Nous avons voulu avec cette étude connaître la prévalence moléculaire de *T. gondii* chez des micromammifères capturés à Cotonou, les génotypes infectant ces différentes espèces et discuter du lien entre la distribution des rongeurs et des génotypes détectés au Bénin. Ce chapitre est étroitement en relation avec le chapitre précédent.

III.2. Matériel et méthodes

III.2.1. Echantillonnage

Nous avons pu profiter de l’échantillonnage de collègues du Laboratoire de Recherche en Biologie Appliquée (Unité de Recherche sur les Invasions Biologiques, URIB) de l’Ecole Polytechnique d’Abomey-Calavi (EPAC) réalisé entre 2017 et 2018. En collaboration avec le Centre de Biologie et Gestion des Populations (CBGP, Montferrier-sur-Lez, France), ils étudient la dispersion des rongeurs natifs et invasifs en Afrique et les enjeux sanitaires, socio-économiques, agricoles et environnementaux associés.

Pour cette étude, les cœurs et cerveaux de 655 rongeurs capturés dans différents quartiers de Cotonou ont été prélevés et envoyés en France pour analyses. Parmi ces animaux, 632 individus ont pu être analysés conjointement pour les deux organes cibles du parasite, le cœur et le cerveau. Du sang a également été récolté sur sérobuvars pour les 138 premiers échantillons envoyés au laboratoire. Le prélèvement de sang a été abandonné par la suite.

Pour des raisons logistiques, deux conditions ont été utilisées pour préserver les organes : à température ambiante dans de l’éthanol pour une partie (310/655) ou congelés frais à -20°C pour les autres (322/655).

III.2.1.1. Présentation des sites d'échantillonnage



Figure 16 : Zones d'échantillonnage des rongeurs à Cotonou
Source : adapté de Google Earth

- Le **port de Cotonou** est un port autonome béninois. Seul port du Bénin, il est également le 3^e port de l'Afrique de l'Ouest après ceux de Lagos et Abidjan, avec un tonnage total de 10,09 millions de tonnes en 2019. Très actif, il enregistrait une hausse de 12% de l'exportation en 2019 par rapport à 2018 (<http://portcotonou.com/index.php/statistiques>).
- **Agla** est l'un des quartiers de Cotonou les plus peuplés, qui historiquement était réputé dangereux en raison de sa zone forestière et marécageuse où s'installaient des hors-la-loi. Mais à partir des années 1970, il devient un quartier plus sécurisé mais soumis aux dégâts des eaux pendant les fortes pluies.
- **Ladji** est situé au bord du lac Nokoué. Avec plus de 10 000 habitants, c'est un quartier très défavorisé qui n'était pas cartographié il y a encore quelques mois.
- **Saint-Jean** est un quartier résidentiel plutôt favorisé avec énormément de lieux de divertissements, notamment le Canal Olympia Wologuédé (seul cinéma de Cotonou), des restaurants et bars, des commerces, des écoles et universités privées, hôpitaux et centres religieux. C'est aussi dans ce quartier que se trouve la Mairie de Cotonou.

III.2.1.2. Micromammifères capturés

La détermination des genres et espèces assurée par l'URIB et le CBGP a été morphologique. C'est pour cela que pour certains mammifères, seul le genre est disponible.

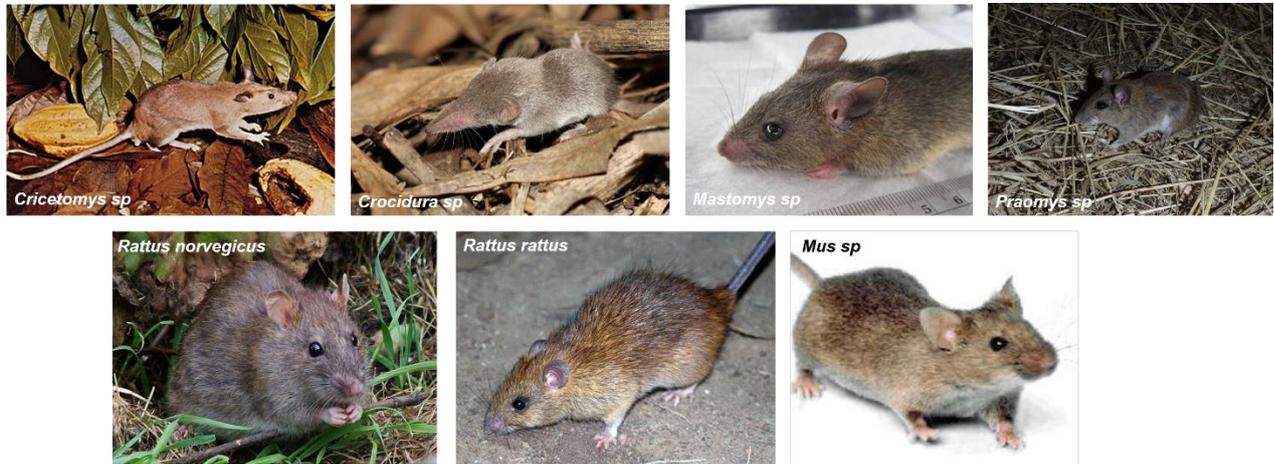


Figure 17 : Les différents espèces de rongeurs et autres micromammifères capturés dans cette étude
Source : Wikipédia

Les descriptions présentées ci-dessous sont en majorité tirées de l'ouvrage de Granjon and Duplantier sur les rongeurs de l'Afrique sahélo-soudanienne (2009) et du guide pour la saisie des données sur faune-alsace « Identification des micromammifères capturés ou trouvés morts » du GEPMA (Groupe d'Etude et de Protection des Mammifères d'Alsace) (Figure 17).

- ***Cricetomys sp.*** (Famille des Nesomyidae)

Les cricétomes sont de gros rongeurs africains autochtones (de 36 à 46 cm et pesant jusqu'à 1,5 kg) qui sont chassés ou élevés pour la consommation humaine. Il existe deux espèces : *Cricetomys emini* (cricétome des forêts) et *Cricetomys gambianus* (cricétome des savanes ou rat de Gambie). Un total de 7 individus (1,1% du total) de ce genre a été capturé à Cotonou, tous dans le quartier de Saint-Jean.

- ***Mastomys sp.*** (Famille des Muridae)

Comme *Cricetomys sp.*, c'est un rongeur endémique à l'Afrique, mais plus petit (10 à 15 cm pour 20 à 80g). Les *Mastomys natalensis* sont connus pour être le principal réservoir du virus de la fièvre de Lassa (fièvre hémorragique transmise par les fèces et urines du Mastomys). Retrouvés sur tous les sites avec 28 individus au total (4,3% du total), ils sont donc un facteur de risque sanitaire pour les populations de Cotonou.

- ***Praomys derooi/daltoni*** (Famille des Muridae)

Endémique au Bénin, Ghana, Nigéria et au Togo, *Praomys derooi* (environ 12 cm pour 30g) vit dans les savanes ou les zones urbaines. Initialement distinguée par Van der Straeten et Verheyen (1978) d'une autre espèce, *Praomys daltoni*, les récentes données génétiques suggère qu'elle serait un sous-groupe *P. daltoni* (Lecompte et al., 2002), il a donc été proposé d'en faire un écotype plutôt qu'une espèce à part entière (Nicolas et al., 2020). Au total, 5 individus (0,8% du total) ont été capturés, essentiellement dans le quartier de Saint-Jean.

- ***Crocidura sp.*** (Famille des Soricidae)

Les crocidures sont des insectivores ressemblant à des musaraignes (5 à 9 cm). Elles s'en distinguent morphologiquement par des dents entièrement blanches, des oreilles bien visibles et la présence de longs poils sur leur queue et leur corps. Les crocidures sont retrouvées dans tous types de climat. C'était le deuxième genre de petit mammifère le plus capturé, avec 189 individus (28,8% du total), et il était présent sur tous les sites d'échantillonnage.

- ***Rattus norvegicus*** (Famille des Muridae)

Communément appelé « rat brun » pour le distinguer du « rat noir », *Rattus norvegicus* est originaire d'Extrême-Orient et a envahi massivement l'Europe au court du XVI^e siècle avec le développement du commerce (Puckett et al., 2016). Cette espèce à l'âge adulte pèse jusqu'à 650g pour 20 à 28 cm et il se cache généralement dans les parties basses des bâtiments.

Il a été majoritairement trouvé dans le port de Cotonou (64 des 80 individus capturés au port) mais a aussi été capturé à Agla et Ladji (12,2% du total).

- ***Rattus rattus*** (Famille des Muridae)

Le rat noir est lui aussi originaire d'Asie et serait arrivé en Europe entre le IV^e et le II^e siècle avant J.-C. (donc bien avant le rat brun) (Audoin-Rouzeau et Vigne, 1998). Il a ensuite colonisé le monde entier avec les voyageurs européens. Il est d'ailleurs très différent du rat brun, de par son mode de vie (omnivore, arboricole avec une préférence pour les fruits et vie en hauteur) mais aussi de par sa taille (15 à 20 cm) et son poids (75 à 230g).

C'est le rongeur qui a été le plus retrouvé pendant ces échantillonnages, avec 240 individus (36,6% du total).

- ***Mus musculus*** (Famille des Muridae)

La taille adulte d'une souris est comprise entre 7,5 et 10 cm. Comme pour le rat brun et le rat noir, c'est une espèce invasive originaire d'Asie qui a profité des colonisations européennes pour s'implanter presque mondialement. En effet, la souris ne semble pas s'être encore réellement implantée sur le territoire béninois car les 106 individus (16,2% du total) capturés

dans cette étude l'ont été dans l'enceinte du port de Cotonou et non dans les terres, ce qui amène à s'interroger sur ce qui l'empêche d'envahir (Hima et al., 2019).

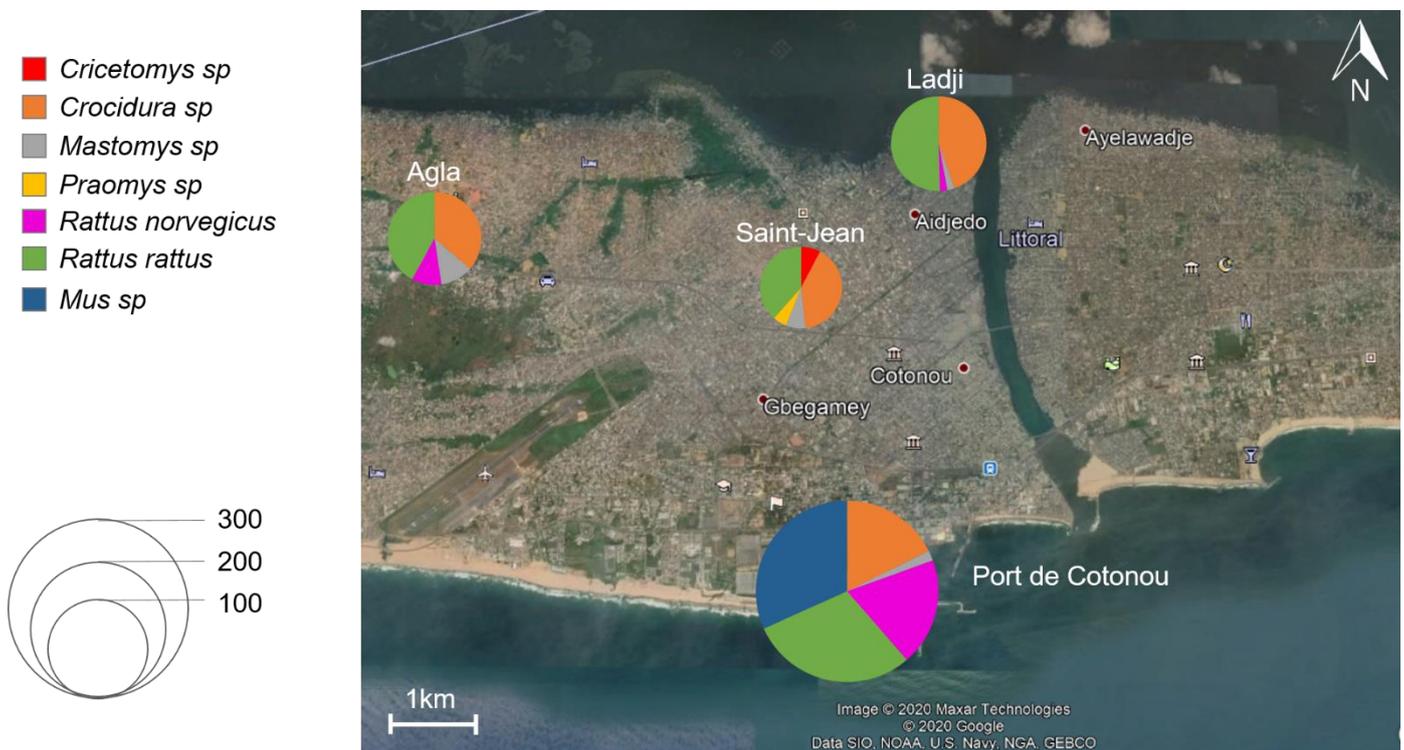


Figure 18 : Répartition géographique des différents genres de rongeurs et autres micromammifères
Source : adapté de Google Earth

La liste des échantillons est présentée en Annexe 4.

III.2.2. Dissection

Les cerveaux et cœurs ont été isolés à Cotonou et préparés pour les qPCR à Limoges à l'UMR 1094. Les cerveaux étaient broyés séparément dans 1mL d'eau physiologique (NaCl 0.9%) et 30mg de cœur (coupés au niveau de l'apex) prélevés pour la qPCR.

III.2.3. Sérologie sur buvars

Le principe se base sur la technique MAT adaptée de Bolais et collaborateurs (2017). Des sérobuvards ont été récupérés pour les 138 premiers échantillons afin de vérifier les résultats de Galal et collaborateurs sur la pertinence de l'utilisation de la sérologie en comparaison à la PCR (gold-standard). Le buvard d'un échantillon était poinçonné dans le puits d'une plaque 64 puits à fond plat et élué dans 80µL de PBS pendant 24h. Ensuite, 36µL de l'éluat sont prélevés et mélangés avec du 2-ME/PBS. Des dilutions en cascade sont réalisées selon le modèle suivant. Le seuil est établi à la dilution 1 : 10.

Tableau 2 : Protocole de dilutions en cascade pour une sérologie sur sérobuvars

Dilution	1 : 10	1 : 16	1 : 100	1 : 800
Concentration de 2ME-PBS	0.5M	0.1M	0.1M	0.1M
Volume 2ME-PBS	9 μ L	12 μ l	36,8 μ L	131,2 μ L
Volume Eluat	36 μ L	20 μ L	7 μ L	18,8 μ L

25 μ l
15 μ L
18,8 μ L

III.2.4. Analyses génétiques : Extraction d'ADN, qPCR (prévalence moléculaire) et génotypage à l'aide des microsatellites (15 MS)

Ces étapes sont similaires à celles citées dans le Matériel et Méthodes de l'article “ **A hotspot of *Toxoplasma gondii* Africa 1 lineage in Benin: How new genotypes from West Africa contribute to understand the parasite genetic diversity worldwide**” par Hamidović et collaborateurs.

Ces analyses ont été réalisées sur 632 individus, à la fois sur le cœur et le cerveau.

Pour la prévalence moléculaire, un individu était considéré positif si l'un des deux organes testés était positif en qPCR. Il n'y a que pour le calcul des prévalences par organe qu'un même individu pouvait être comptabilisé deux fois.

III.2.5. Analyses statistiques

Les logiciels R 4.0.2 (<https://cran.r-project.org/>) et SPSS 23.0 (<https://www.ibm.com/fr-fr/analytics/spss-statistics-software>) ont été utilisés pour réaliser les tests statistiques.

Le coefficient Kappa a été calculé afin de déterminer la concordance entre les techniques utilisées (sérologie *versus* qPCR) et interprété selon la table de McHugh (2012).

Afin d'étudier la corrélation entre les positifs en qPCR/organe, un test de Fisher a été réalisé avec R. L'analyse comparative de variables qualitatives de l'échantillonnage (sexe, espèce et quartier) a été faite avec des tests de Chi-2 et Fisher.

III.2.6. Comité d'éthique et protocole de Nagoya

L'échantillonnage a été réalisé sous l'accord de recherche signé le 30 septembre 2010 entre la République du Bénin et l'IRD. Tous les piégeages ont été réalisés avec l'accord des communautés locales (familles, propriétaires d'entreprise) et des administrations (Mairie de Cotonou). Aucune des espèces capturées dans cette étude n'est espèce protégée (liste CITES). Tous les animaux ont été euthanasiés dans le respect du bien-être animal en suivant les directives de la Société Américaine de Mammologistes (Sikes et Gannon, 2011).

III.3. Résultats

III.3.1. Séroprévalence

Au total, 138 sérologies ont été réalisées sur cinq espèces toutes capturées dans le port de Cotonou (Tableau 3).

Tableau 3 : Séroprévalence vis-à-vis de *T. gondii* selon l'espèce

Espèce	Nombre d'animaux	Séroprévalence (n+)	Titre			
			1 : 10 (seuil)	1 : 16	1 : 100	1 : 800
<i>Crocidura sp.</i>	37	25% (9)		9		
<i>Rattus rattus</i>	25	4% (1)		1		
<i>Rattus norvegicus</i>	22	4.5% (1)	1			
<i>Mus musculus</i>	52	4% (4)		3		1
<i>Mastomys sp.</i>	2	0%				
Total	138	10,9% (15)				

Ces résultats nous semblaient prometteurs et nous avons donc initialement ciblé nos analyses de prévalence moléculaire sur les individus séropositifs, pour finalement tous les analyser.

III.3.1.1. Concordance séroprévalence et prévalence moléculaire

Sur les 138 sérologies réalisées (Tableau 3), des résultats concordants entre la prévalence moléculaire et la séroprévalence n'ont été retrouvés que pour 2 échantillons venant de cœurs

de deux crocidures. Le coefficient Kappa est de 0,01, indiquant aucune concordance d'après McHugh. Nous considérons la qPCR comme le gold-standard pour la détection de *T. gondii* et avons donc décidé d'abandonner la sérologie et de ne réaliser que des analyses PCR pour tous les animaux et organes disponibles. Le taux de faux-positifs en sérologie monte à 8% (IC 95%: [3,5;12,6]), tandis que le taux de faux-négatifs est de 21,9% (IC 95: [14,9;28,8]).

III.3.2. Comparaison des conditions de stockage : congélation versus éthanol

Sur les 632 échantillons, environ la moitié (310/632) était préservée en alcool, et les 322 échantillons restants étaient congelés. Parmi les échantillons en alcool, 56 sont positifs en qPCR (18%), contre 40 pour les échantillons congelés (12,4%), sans différence significative entre les deux conditions ($p > 0,05$).

III.3.3. Prévalence moléculaire détaillée selon l'espèce, l'organe et le quartier

Tableau 4 : Prévalence moléculaire de *T. gondii* selon l'hôte, l'organe et le quartier

Espèce	Nombre d'animaux	Prévalence moléculaire par organe (n+)		Prévalence moléculaire par quartier (n+)				Prévalence moléculaire globale (n+)
		Cerveau	Cœur	Port	Agla	Ladji	Saint-Jean	
<i>Crocidura sp.</i>	179	14,5% (26)	12,3% (22)	19,3% (11)	12,8% (5)	18,4% (9)	29,4% (10)	19,6% (35)
<i>Rattus rattus</i>	234	6,4% (15)	3,4% (8)	14,4% (14)	8,9% (4)	5,2% (3)	5,9% (2)	10,9% (23)
<i>Rattus norvegicus</i>	77	6,5% (5)	7,8% (6)	14,8% (9)	9,1% (1)	20% (1)	0%	14,3% (11)
<i>Mus musculus</i>	102	14,7% (15)	5,9% (6)	21,6% (21)	0%	0%	0%	20,6% (21)
<i>Mastomys sp.</i>	28	7,1% (2)	3,6% (1)	0%	8,3% (1)	33,3% (1)	14,3% (1)	10,7% (3)
<i>Cricetomys sp.</i>	7	0%	14,3% (1)	0%	0%	0%	14,3% (1)	14,3% (1)
<i>Praomys sp.</i>	5	0	40% (2)	0%	0%	0%	40% (2)	40% (2)
Total	632	9,9% (63)	7,3% (46)	17,1% (55)	10,3% (11)	12,2% (14)	18,4% (16)	15,2% (96)

Tous les résultats sont compilés dans le Tableau 4. Une prévalence moléculaire globale de 15,2% (IC 95: [12,39;17,99]) a été retrouvée. Le groupe des *Praomys sp.* semble présenter la plus forte prévalence avec 40% (IC 95% : [0,00;82,94]) mais avec un faible effectif, suivi du groupe *Mus musculus* avec 20,6% (IC 95%: [12,74;28,44]), puis des *Crocidura sp.* avec 19,6%

(IC 95%: [13,74;25,36]), des *Rattus norvegicus* avec 14,3% (IC 95%: [6,47;22,10]) et des *Cricetomys sp.* avec 14,3% également (IC 95%: [0,00;40,21]), des *Rattus rattus* avec 10,9% (IC 95%: [6,01;13,64]), et des *Mastomys sp.* avec 10,7% (IC 95%: [0,00;22,17]).

Concernant les organes, aucune différence significative n'a été retrouvée avec une prévalence de 9,9% (IC 95 : [7,63;12,30]) dans le cerveau et de 7,3% (IC 95: [5,25;9,30]) dans le cœur. Des résultats positifs dans les deux organes pour un même individu n'ont été observés que dans quatre cas.

Les quartiers avec la plus forte prévalence sont le port de Cotonou et le quartier de Saint-Jean avec respectivement 17,1% (IC 95: [12,93;21,13]) et 18,4% (IC 95 : [10,25;26,53]) d'animaux positifs, suivi de Ladji avec 12,2% (IC 95: [6,20;18,15]) et enfin Agla avec 10,3% (IC 95: [4,53;16,03]).

III.3.4. Génotypages

Les échantillons ne permettent que des qPCR directes car il est impossible d'en isoler des souches. Les génotypages sont donc souvent incomplets mais nous avons tout de même pu décrire sept nouveaux génotypes Africa 1 sur les échantillons n°803, 918, 954, 1000, 1491, 1589 et 1616 (Tableau 7).

Tableau 5 : Echantillons génotypés, localisation géographique, génotype et taille des marqueurs microsatellites

Echantillon	Espèce	Quartier	Génotype	TUB2	W35	TgM-A	B18	B17	M33	M IV.1	M XI.1	M48	M102	N60	N82	AA	N61	N83
803	<i>Rattus rattus</i>	Port	Africa 1 (10/15)	291	248	205	NA	342	165	274	354	229	166	NA	NA	269	NA	NA
918	<i>Crocidura sp.</i>	Agla	Africa 1 (13/15)	291	248	205	160	342	NA	274	354	227	166	147	111	269	NA	306
954	<i>Crocidura sp.</i>	Agla	Africa 1 (13/15)	291	248	205	160	342	NA	274	354	221	166	149	NA	275	89	306
1000	<i>Crocidura sp.</i>	Ladji	Africa 1 (14/15)	291	248	205	160	342	NA	274	354	227	166	147	111	269	89	306
1491	<i>Crocidura sp.</i>	Ladji	Africa 1 (12/15)	291	248	205	NA	342	NA	274	354	225	166	147	NA	267	91	306
1589	<i>Crocidura sp.</i>	Saint-Jean	Africa 1 (10/15)	291	248	205	160	342	NA	NA	354	227	NA	147	NA	267	89	NA
1616	<i>Crocidura sp.</i>	Saint-Jean	Africa 1 (11/15)	291	248	NA	160	342	NA	274	354	225	NA	147	NA	273	87	306

III.4. Discussion

Cette étude est en continuité avec notre précédent travail sur les volailles au Bénin (Hamidović et al., accepté dans PLOS Neg), mais sur des hôtes différents : les micromammifères autochtones (*Crocidura sp.*, *Mastomys sp.* et *Cricetomys sp.*) et invasifs (*Rattus rattus*, *Rattus norvegicus* et *Mus musculus*). Ces espèces ont un rôle important dans le cycle de *T. gondii*,

permettant le maintien de certaines lignées dans la nature. Mais l'importation d'espèces invasives depuis l'Europe en Afrique aurait amené de nouveaux génotypes sur le territoire sénégalais (Galal et al., 2019a). Au Bénin, un total de 632 individus, représentant toutes les espèces et tous les quartiers, ont été inclus. Le sang de 138 de ces individus et le cœur et le cerveau pour la totalité des individus ont été collectés.

Ici, après un premier screening en sérologie, nous avons décidé de nous focaliser sur la prévalence moléculaire en raison d'un problème de concordance entre sérologie et PCR. Avec la PCR comme technique de référence, le taux de faux séronégatifs (21,9%) était bien plus élevé que celui des faux séropositifs (8%).

Ce problème de concordance entre la sérologie et la PCR n'est pas nouveau (Aroussi et al. 2015). Galal et collaborateurs l'avaient d'ailleurs déjà observé sur une précédente étude sur des micromammifères du Sénégal. Plusieurs hypothèses avaient été proposées par Galal et collaborateurs en 2019 pour comprendre ce manque de sensibilité du test sérologique MAT chez les micromammifères sauvages. C'est également dans cet article que les auteurs ont discuté de l'invalidation de la sérologie MAT pour la grande majorité des rongeurs et autres micromammifères échantillonnés. La seule espèce pour laquelle les résultats de séroprévalence et de prévalence moléculaire étaient concordants était *Cricetomys gambianus*. Malheureusement, dans notre échantillonnage partiel, seul un individu de cette espèce a été testé (il y en a sept au total) et nos résultats étaient discordants entre la sérologie et la qPCR, amenant donc à une discordance de 100%. En revanche, nos résultats viennent confirmer les résultats de discordance chez *Mus musculus*, *Rattus rattus* et *Crocidura sp.* ajoutent également des preuves de discordance pour deux nouvelles espèces : les *Rattus norvegicus* et les *Mastomys sp.*

Toutes ces limites nous ont amené à ne plus utiliser de sérologies au profit de la qPCR afin de déterminer la prévalence de l'infection. La prévalence moléculaire globale était de 15,2% (IC 95: [12,39;17,99]), espèces et quartiers confondus. Deux conditions de stockage des organes ont été utilisées (alcool *versus* congélation) et aucune différence significative sur les résultats qPCR n'a été retrouvée. Cette absence de différence lors de la conservation d'échantillons en éthanol pourrait constituer une véritable plus-value pour de futurs travaux sur le terrain et le transport d'échantillons.

Deux organes par espèce ont également été testés : le cœur et le cerveau. Ils sont tous les deux des organes de tropisme du parasite et nos résultats suggèrent de continuer de les tester conjointement lors d'une étude de prévalence. En effet, seul quatre individus étaient positifs pour les deux organes et il serait aisé d'en manquer si seul l'un des deux organes était prélevé.

D'après la littérature disponible, la seule autre étude de prévalence moléculaire chez des rongeurs sauvages en Afrique de l'Ouest et Centrale a été faite au Sénégal par Galal et collaborateurs où ils avaient trouvé une prévalence moléculaire globale de 17,5%, semblable à la nôtre. Cependant, il faut noter que cette étude au Sénégal ne se basait que sur des échantillons de cerveaux de *Crocidura sp.*, *R. rattus* et *Cricetomys gambianus*. Notre étude amène donc de nouvelles données sur le cœur, un autre organe de tropisme du toxoplasme, mais aussi sur une nouvelle espèce : *R. norvegicus*.

Dans cette étude, aucune différence significative n'a été retrouvée entre les variables « quartier » ou « espèce ». La forte prévalence retrouvée chez la souris domestique, qui d'ailleurs n'a été capturée qu'au Port de Cotonou, quartier où la prévalence est également la forte, n'a malheureusement pas permis de génotyper les souches infectant ces animaux, les qPCR chez ces souris indiquant une trop faible quantité d'ADN. Les légères différences de prévalence entre espèces, bien que non significatives, pourraient être expliquées par le mode de vie de ces animaux, notamment *R. rattus* qui vit en hauteur et est principalement fructivore tandis que *R. norvegicus* préférant vivre au sol est potentiellement plus en contact avec des oocystes. La forte prévalence chez *Crocidura sp.* est également explicable par son habitude à creuser le sol pour consommer des vers et rechercher des insectes (Clausnitzer et al., 2003; Churchfield et al., 2004), qui sont des hôtes paraténiques de *T. gondii* (Bettioli et al., 2000). Mais ces suppositions se basent sur une transmission orale du parasite. Or, le mode de transmission chez les populations naturelles de micromammifères n'est pas encore résolu (J. P. Dubey 2010, 200) et plusieurs études ont rapporté des prévalences élevées chez des micromammifères dans des zones avec peu voire pas de félidés (Murphy et al., 2008; Thomasson et al., 2011). Ceci a amené ces études à imaginer une perpétuation du cycle parasitaire via une transmission congénitale sur des générations successives. Il a d'ailleurs été montré expérimentalement chez *R. norvegicus* qu'une transmission congénitale était possible jusqu'à la deuxième génération (F2) lorsque la mère de la génération zéro (F0) était contaminée par des oocystes (Dubey et al., 1997). Ceci pourrait expliquer la forte prévalence retrouvée dans le Port de Cotonou, due aux souris domestiques, qui comme emprisonnées dans cette zone, se reproduisent entre elles et se transmettent le toxoplasme de générations en générations. Mais quel processus empêche leur propagation au Bénin ?

La génétique du parasite pourrait être en cause. Les sept échantillons qui ont pu être génotypés pour une grande partie des marqueurs ont tous été classés comme appartenant à la lignée Africa 1, une lignée autochtone africaine (Galal et al., 2018). Ils ont été retrouvés chez six crocidures et un rat noir dans quatre quartiers différents : le Port, Agla, Ladji et Saint-Jean. Ce résultat n'est pas surprenant pour des échantillons prélevés au Bénin, où une prédominance écrasante de cette lignée a été retrouvée sur l'ensemble du territoire

(Hamidović et al., accepté dans PLOS Neg) mais aussi dans toute l'Afrique tropicale (Galal et al., 2018). A noter qu'un cinquième génotype très incomplet d'un échantillon non inclus dans les résultats de génotypage présente un génotype ni Africa 1 ni Type II mais potentiellement Africa 4, comme déjà retrouvé dans le Nord du Bénin. Les souches Africa 1 sont classées comme virulentes chez la souris de laboratoire (Mercier et al., 2010; Galal et al., 2019a ; Hamidović et al., accepté dans PLOS Neg) et le lien entre souches virulentes et disponibilité des hôtes fait l'état de nombreuses discussions concernant leur contribution dans la diversité génétique du toxoplasme à travers le monde. Il a été montré que le type II européen se serait implanté au Sénégal pendant le commerce triangulaire en concomitance avec la souris domestique (Dalecky et al., 2015) Pourtant au Bénin, malgré une histoire coloniale similaire, ce phénomène n'est pas observé, ou du moins pas encore. En effet, d'après l'échantillonnage de cette étude et de celle de Hima et collaborateurs en 2019, la souris domestique reste cantonnée au Port de Cotonou, alors que d'autres espèces invasives comme le rat noir ou le rat brun sont retrouvés dans les terres (Figure 18). Ceci s'expliquerait par les différences de virulence des souches Africa 1 chez ses hôtes : une souche virulente telle que la RH est mortelle pour la souris domestique alors qu'elle est bien tolérée par les rats (Fujii et al., 1983). Il est donc possible que les souris positives soient infectées par des souches de Type II ou autre génotype non virulent et qu'une réinfection par un type plus virulent les tue (Dao et al., 2001; Gaballah et al., 2018), les empêchant de disséminer sur l'ensemble du territoire et par conséquent d'implanter le Type II au Bénin.

Cependant, bien que la souris domestique ne soit pas retrouvée en dehors du Port à Cotonou, elle a tout de même réussi à traverser le pays sur l'axe routier Cotonou-Niger et à être observée exclusivement au Grand Marché de Niamey (Hima et al., 2019). Cette invasion étant un processus en cours selon Hima et collaborateurs, il est donc fortement probable que les prévalences et les génotypes découverts au Bénin en 2018 changent et qu'une diversité de *T. gondii* similaire au Sénégal s'installe à l'avenir.

III.5. Données complémentaires

Avec l'autorisation de nos collaborateurs au Bénin, dix échantillons de *Mus musculus* sélectionnés aléatoirement ont été envoyés à l'équipe de Jonathan Howard à l'Instituto Gulbenkian de Ciência (Oeiras, Portugal) afin d'étudier la présence d'allèles spécifiques aux IRG (Immunity-Related GTPase) dans ces échantillons.

Les IRG sont un système de résistance permettant de limiter la pathogénicité de *T. gondii* chez les rongeurs. Cependant, certaines souches (comme la RH) arrivent à contourner cette barrière (Zhao et al., 2009; Steinfeldt et al., 2010; Müller and Howard, 2016; Murillo-León et al., 2019) et sont donc virulentes voire létales pour l'hôte infecté. Mais la virulence n'est pas

seulement souche dépendante, elle est également hôte dépendant. La co-évolution entre l'hôte et son pathogène a permis la création de mécanismes de défense immunitaire suite à la pression de sélection exercée par ces micro-organismes. Les gènes *Irg* sont conservés chez les souris de laboratoire alors qu'une plus grande diversité est observée chez des souris dérivées de souris sauvages (Lilue et al., 2013). Le tandem le plus étudié actuellement est *Irgb2-b1_{CIM}* chez *M. m. castaneus*, notamment pour la résistance qu'il confère face à des souches virulentes, mais d'autres tandems existent, notamment le tandem *Irgb2-b1_{PWK}* chez la *M. m. musculus* (PWK/Ph).

Comme expliqué dans le premier chapitre de cette thèse, l'Amérique du Sud est l'un des continents avec la plus grande diversité de souches de toxoplasme mais aussi un grand nombre de souches virulentes. Ceci aurait donc dû empêcher l'invasion de la souris domestique eurasienne en Amérique du Sud et pourtant la souris domestique est implantée en Amérique du Sud depuis 500 ans (Alvarez, présentation congrès Toxo XV). Il a été découvert chez des *M. m. domesticus* brésiliennes une forte prévalence de l'allèle *Irgb2-b1_{PWK}* qui agit comme un antagoniste de la virulence et permet à l'immunité de l'hôte de contrôler la virulence de ces souches sud-américaines contrairement à l'allèle *Irgb2-b1_{CIM}* (Murillo-León et al., 2019). Il y aurait donc eu une sélection de cet allèle parmi le pool d'allèles d'IRG importés avec les souris domestiques eurasiennes pour permettre une résistance aux souches autochtones normalement virulentes pour ces hôtes.

Concernant nos échantillons, environ 50% des souris du Port de Cotonou envoyées pour analyse (n=10) portaient cet allèle *Irgb2-b1_{PWK}* (Alvarez, communication personnelle). Il y aurait donc des souris potentiellement résistantes à des souches virulentes telles que les Africa 1 au Bénin, ce qui remettrait en cause notre hypothèse concernant l'impossible invasion de la souris domestique due à la virulence des souches autochtones.

Autre fait intéressant, certaines souris du Bénin portaient un nouvel allèle du gène *Irgb2-b1* considéré comme « Spretus-like » (Alvarez, communication personnelle). *Mus spretus* est une souris d'Afrique du Nord (mais qui est aussi retrouvée en Espagne et dans le Sud de la France) qui possède un allèle *Irgb2-b1* spécifique à cet hôte (SPRET). Murillo-Leon et collaborateurs ont généré une phylogénie des séquences *Irgb2* qui montrait une grande proximité entre les *Irgb2_{PWK}* et les *Irgb2_{SPRET}*. Nous pouvons donc imaginer que ce nouvel allèle « Spretus-like » s'intégrerait parfaitement dans l'arbre phylogénétique aux côtés de PWK et SPRET.

La présence des allèles *Irgb2-b1_{PWK}* et le nouvel allèle « Spretus-like » plutôt que l'allèle *Irgb2-b1_{CIM}* dans la population de souris béninoises suggérerait une sélection positive de cet allèle pour se protéger de souches de toxoplasmes sud-américaines et africaines qui seraient donc proches en termes de virulence et contrôle de l'infection. Il serait intéressant de vérifier la

virulence de l’Africa 1 chez des rongeurs sauvages autochtones et invasifs afin de valider ou infirmer nos hypothèses. D’un point de vue immunologique, il faudrait étudier les cibles de ces Irgb2-b1_{PWK} et « Spretus-like » lors d’une infection, notamment en étudiant le complexe ROP5/ROP18 kinase de ces souches qui est souvent impliqué dans la virulence (Lilue et al. 2013).

Chapitre IV. A la recherche d'introgessions dans le génome de *Toxoplasma gondii*

IV.1. Introduction

IV.1.1. Description du génome du toxoplasme

Toxoplasma gondii est le modèle idéal de recherche sur les apicomplexes (Kim and Weiss, 2004). Etant des eucaryotes unicellulaires, le génome des parasites comme *T. gondii* est composé d'ADN nucléaire mais aussi mitochondrial. Dans le cas du toxoplasme (Figure 19), la taille de son génome est environ 65Mb réparti sur 14 chromosomes (Lorenzi et al., 2016), même si des discussions émergent sur ce nombre de chromosomes (Xia et al., preprint). Actuellement, la plupart des données génétiques sur *T. gondii* sont stockées sur ToxoDB.org qui est une ressource en ligne gratuite permettant l'accès à des données génomiques de *T. gondii*. Elle compte à ce jour 18 génomes de référence (ME49, VEG, GT1, GAB2-2007-GAL-DOM, TgCatPRC2, ARI, FOU, VAND, RUB, MAS, p89, RH, TgCATBr9, TgCATBr5, CAST, COUG, CtCo5 et TgCkUg2), annotés pour environ la moitié d'entre eux (Harb, Kissinger, and Roos, 2020) et dont la grande majorité est tirée de la publication de 2016 par Lorenzi et collaborateurs rassemblant 62 génomes de *T. gondii* de différentes régions du monde. Cet article est celui ayant le plus participé à ce jour à l'étude de la génétique des populations de *T. gondii* à travers son génome.

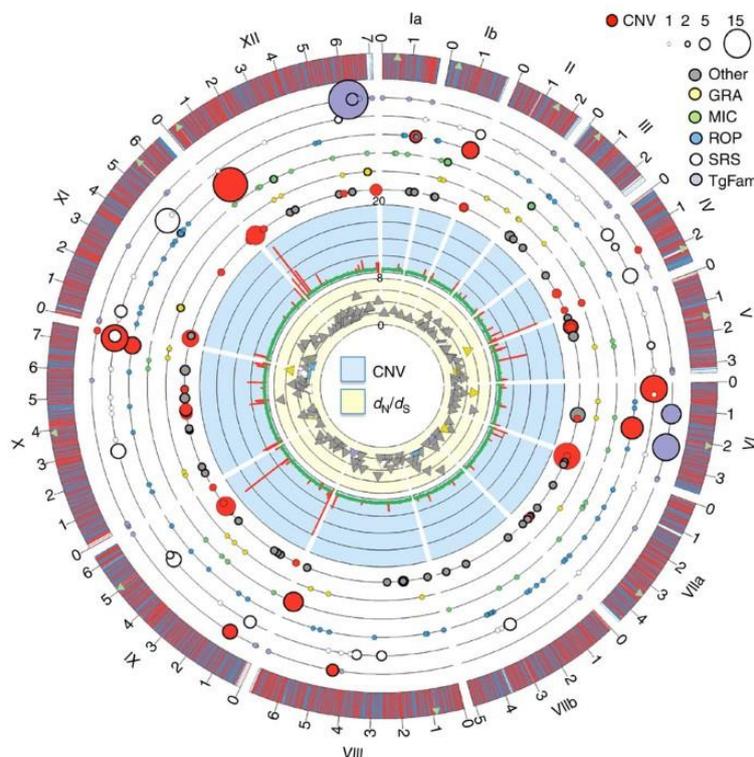


Figure 19 : Schématisation circulaire du génome de *T. gondii* basé sur la souche de référence ME49. Les grandes familles de protéines ont été représentées par des cercles de couleurs et sont réparties sur l'ensemble du génome
Source : Lorenzi et al., 2016

L'hypothèse initiale de cet article est que la pathogénicité de *T. gondii* et la gamme d'hôtes disponibles dépendraient de son répertoire de déterminants sécrétoires de la pathogénicité (SPDs pour secretory pathogenesis determinants, e. g. les sérine/thréonines kinases dont font partie les rhoptyr kinases, protéines clés de la virulence de *T. gondii*).

Leur travail a montré que :

- Les 62 souches de *T. gondii*, comparées à d'autres parasites proches (*Sarcocystis neurona*, *Neospora caninum*, *Hammondia hammondi*), ont révélé une expansion et une diversification des déterminants de la pathogénicité. Ces déterminants, généralement par tandems sur le génome, sont des caractéristiques majeures des génomes de *T. gondii* et autres coccidies kystogènes.
- Les blocs de motifs hérités à la suite de récentes recombinaisons ou d'une sélection positive pourraient contribuer à des traits spécifiques partagés entre lignées proches de *T. gondii*. Au sein d'une lignée, les souches partagent des combinaisons de déterminants sécrétoires de la pathogénicité spécifiques et c'est ce qui définit la structure des populations du toxoplasme avec des implications dans l'évolution de la transmission, la gamme d'hôtes disponibles et la pathogénicité.

IV.1.2. Mécanismes impliqués dans la diversité génétique de *Toxoplasma gondii*

La biologie est une discipline en constante évolution et la génétique moderne porte de plus en plus sur l'étude de processus biologiques à l'échelle du génome.

La découverte chez *T. gondii* d'une diversité génétique complexe, de formes cliniques particulières en lien avec des génotypes singuliers et l'exploration de zones géographiques plus diversifiées (notamment tropicales) ont amené à s'interroger sur l'évolution de ce parasite. Par exemple, les génotypes retrouvés en Amérique du Sud sont plus virulents que ceux retrouvés dans l'hémisphère Nord. Mais les facteurs influençant cette diversité et cette virulence ne sont pas clairs, malgré plusieurs modèles d'histoire évolutive proposés (Morrison, 2005), qui évoluent au fur et à mesure de la découverte de nouveaux génotypes et de techniques d'analyses du génome. En revanche, il est vraisemblable que le parasite et ses hôtes définitifs auraient co-évolué ensemble pour tout ou partie de leur histoire évolutive.

En effet, l'existence d'un cycle sexué chez les hôtes définitifs du parasite, seul moment où des recombinaisons génétiques sont possibles, est sûrement à l'origine d'une grande partie de la diversité génétique observée aujourd'hui. Chez les félinés, le zygote diploïde produit de la fécondation entre un microgamète et un macrogamète va se différencier en oocyste au cours d'une méiose (sporogonie) qui va venir rétablir l'haploïdie du parasite. C'est au cours de cet événement que des recombinaisons génétiques sont possibles via deux mécanismes :

l'assortiment indépendant (principe mendélien de séparation indépendante des chromosomes homologues) et le crossing-over (échange de fragments de chromatides entre des chromosomes homologues). Cependant, pour qu'une recombinaison se fasse, il faut une infection conjointe par deux souches différentes. Cet évènement est d'autant plus rare que le « self-mating » (auto-fécondation) est une stratégie utilisée par le parasite pouvant faciliter l'expansion clonale de certains génotypes, notamment lors d'épidémies (Wendte et al., 2010). Les premières études sur la diversité génétique de *T. gondii* ont d'ailleurs très longtemps considéré que la reproduction du parasite était clonale avec les trois lignées principales Types I, II et III. Ces types avaient été isolés à partir d'échantillons d'animaux du cycle domestique et plusieurs études suggèrent que le développement de l'agriculture il y a 11000 ans a établi le cycle entre les rongeurs et le chat domestique (Khan et al., 2007; Shwab et al., 2018). Cette spécification d'hôtes a donc très certainement permis de sélectionner certaines lignées de *T. gondii*. Mais si ceci est vrai pour l'hémisphère Nord et des environnements anthropisés, la diversité génétique observée en milieu sauvage est généralement différente.

IV.1.3. Le volet génomique du projet Introtox

Afin de répondre à certains objectifs du projet ANR, il était prévu de séquencer plus d'une centaine de nouveaux génomes de souches issues d'échantillons des missions de terrain de Mercier, Galal, Hamidović et collaborateurs respectivement au Gabon, Sénégal et Bénin en plus d'une sélection d'échantillons provenant du CRB Toxoplasma (échantillons de France, Espagne, Portugal, Royaume-Uni, Serbie, Turquie, Tunisie, Congo, République Démocratique du Congo, République Centrafricaine, Ethiopie, Etats-Unis, Guyane française et Guyana, Guadeloupe, Chili, Argentine et Brésil). Leur séquençage avait pour objectif de mettre en évidence des phénomènes d'introgession génomique (transfert de matériel génétique d'un individu à un autre par recombinaison) au sein de souches isolées dans diverses régions du monde, notamment la France, l'Afrique de l'Ouest et Centrale, auxquels s'est ajoutée l'Amérique du Sud en raison de leur histoire coloniale commune. Ces flux de gènes auraient amené à la création de génotypes recombinants notamment au niveau de « ponts d'échanges », résultant souvent d'activités humaines intenses (commerce maritime passé et actuel). Ces évènements d'hybridation entre souches de *T. gondii* sont probablement rares et plus facilement reproductibles en laboratoire que dans la nature mais ils sont sûrement un moteur important dans l'évolution et la dissémination de traits épidémiologiques de certaines souches, notamment la virulence et les dynamiques de transmission (Grigg et al., 2001; Khan et al., 2009).

Initialement, le projet se focalisait sur un sens d'échanges « Europe vers Afrique ». Avec les résultats de l'étude au Bénin présenté dans le Chapitre II et la prise en compte de l'ensemble des sites géographiques concernés par la traite négrière et le commerce colonial, nous avons

décidé d'ajouter au projet l'hypothèse d'échanges depuis l'Afrique vers l'Amérique du Sud (plus spécifiquement le Brésil). Ceci devrait permettre de vérifier la possibilité d'introductions de souches africaines au Brésil mais aussi d'introgressions de portions de génomes africains notamment au sein des génomes de souches brésiliennes.

Ce volet du projet en est encore à des débuts et les premières analyses n'ont pu être faites qu'en octobre 2020.

IV.2. Matériel et méthodes

IV.2.1. Séquençage des génomes

Dans le cadre du projet Introtox, plus d'une centaine d'échantillons a été envoyée à la plateforme de génomique de l'Institut Cochin (GENOM'IC ; <https://www.institutcochin.fr/les-plateformes/genomique-et-transcriptomique>) pour séquençage de génome complet sur le séquenceur NextSeq 500 d'Illumina. Le protocole reste pour l'instant confidentiel car il sera intégré dans une publication prochaine de Galal et collaborateurs.

Les souches (provenant de nos missions ou du CRB) avaient été sélectionnées afin de représenter un maximum de lignées de toxoplasme mais aussi des souches classées comme « Atypiques » ou recombinantes avec les techniques actuelles de génotypage (15 MS ou RFLP). Ces souches avaient été amplifiées au préalable sous forme tachyzoïte en culture cellulaire de rein de singe vert (*Chlorocebus sabaues*). Ce protocole permet d'avoir une quantité d'ADN toxoplasmique suffisante et de bonne qualité. Les cultures sont ensuite filtrées à travers des membranes nucléopores pour éliminer les potentiels débris cellulaire et maximiser la quantité d'ADN de *T. gondii* par rapport à l'ADN des cellules hôtes.

C'est lors de l'étape de bioinformatique que le génome du toxoplasme peut être totalement isolé et « purifié » en enlevant les séquences identifiées *Chlorocebus sabaues* dont le génome est connu, annoté (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000409795.2) et donc distinguable de celui du toxoplasme. Différentes étapes classiques de bioinformatique ont été utilisées pour préparer les différentes séquences: trimming (pour enlever les reads de mauvaise qualité et les adaptateurs), mapping (pour filtrer le génome de *C. sabaues*), élimination des duplicats et des analyses de qualité entre chaque étape.

Pour cette thèse, nous nous focaliserons sur 16 génomes (suite sur la page suivante) :

- TgA105001 (Gabon)
- TgA105002 (Gabon)
- TgA117008 (Sénégal)
- TgA117020 (Sénégal)
- TgA117052 (Sénégal)
- TgA119001 (Bénin)
- TgA119002 (Bénin)
- TgA119004 (Bénin)
- TgA119005 (Bénin)
- TgH102001A (Turquie)

- TgH102002A (Turquie)
- TgCatBr09 (Brésil) : HG 6
- TgCatBr26 (Brésil)
- TgCatBr34 (Brésil)
- TgCatBr72 (Brésil)
- TgCkBr141 (Brésil)

Les souches utilisées ici sont toutes proches génétiquement car classées au sein du Clade A par Lorenzi et collaborateurs en 2016. Les génomes en rouge sont des échantillons classés comme Africa 1 avec les 15 MS : neuf d'Afrique de l'Ouest (échantillons isolés d'animaux du Gabon, du Sénégal et du Bénin) et deux de Turquie (échantillons isolés de prélèvements humains). Les cinq autres génomes en bleu sont issus d'échantillons d'animaux du Brésil, classés comme atypiques en 15 MS. Parmi eux, la souche TgCatBr09 a également été classé dans l'haplogroupe 6 (HG 6) par Su et collaborateurs (2012), tout comme la souche FOU (souche humaine de référence Africa 1 en 15 MS, non incluse ici).

Pour ces premières analyses, l'intégralité du génome n'a pas été intégrée, seuls l'ont été les gènes de métabolisme (car régions du génome avec moins de pression de sélection et obéissant à une horloge moléculaire en théorie plus stable).

IV.2.2. Comparaison des séquences avec simPLOT

A l'aide du logiciel SeaView (<http://doua.prabi.fr/software/seaview>), nous avons comparé chaque fichier correspondant à un génome brésilien (défini comme référence) avec tous les génomes Africa 1, ce qui a abouti à cinq comparaisons de proximité des génomes Africa 1 au génome brésilien mis en référence.

Les fichiers ont ensuite été analysés sous R 4.0.2 (<https://cran.r-project.org/>) avec un script utilisant simPLOT (Annexe 6). Un seuil de similarité à 0,998 a été utilisé (ligne en pointillés rouges). En dessous de ce seuil, la variabilité n'est plus considérée comme d'intra-lignée. Les fichiers pdf générés à la fin de chaque analyse ont ensuite été retravaillés sur Adobe Illustrator pour plus de lisibilité.

IV.2.3. Identification précise des portions communes des génomes comparés

Pour chacun des gènes de métabolisme, nous avons écarté les parties non variables via un script afin de ne garder que les parties variables (Annexe 7). Les séquences générées ont ensuite été concaténées par chromosome et des arbres Neighbor-Joining comprenant une des cinq souches brésiliennes et les souches Africa 1 ont été réalisés pour chaque chromosome avec le logiciel Geneious Prime (<https://www.geneious.com/>).

IV.3. Résultats

IV.3.1. Comparaison des séquences avec simPLOT

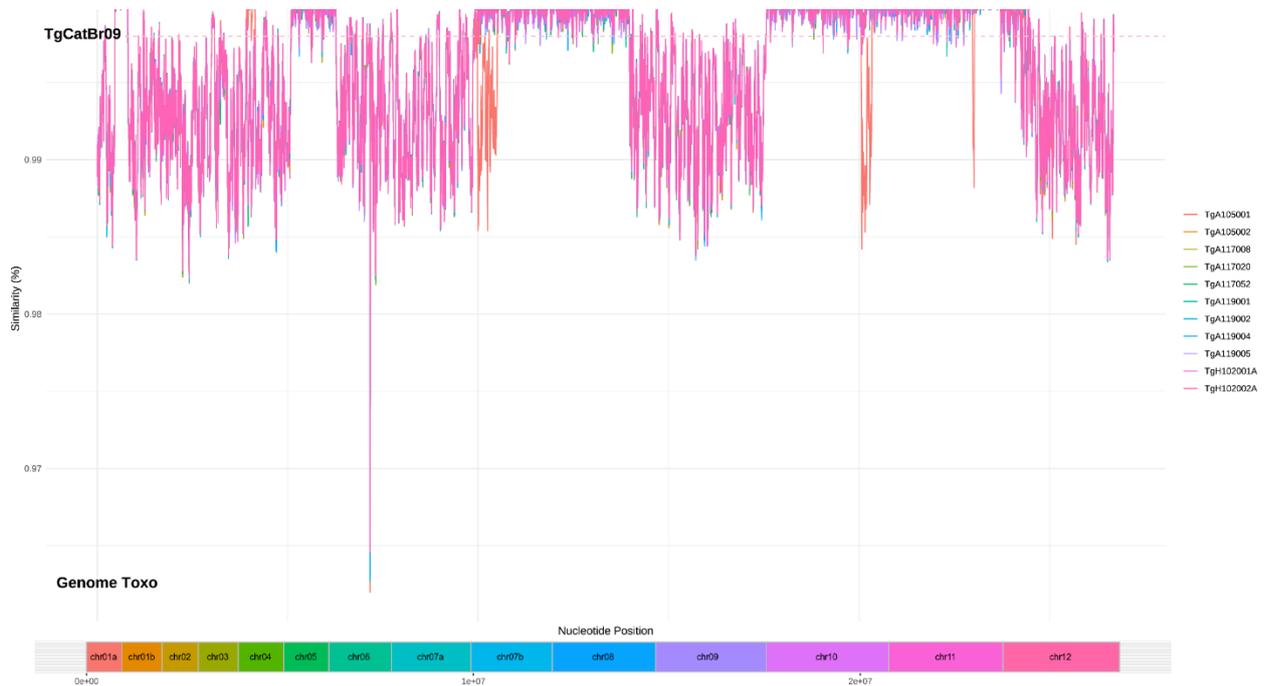


Figure 20 : Comparaison de **TgCatBr09** (référence) aux 11 génomes Africa 1



Figure 21 : Comparaison de **TgCatBr26** (référence) aux 11 génomes Africa 1

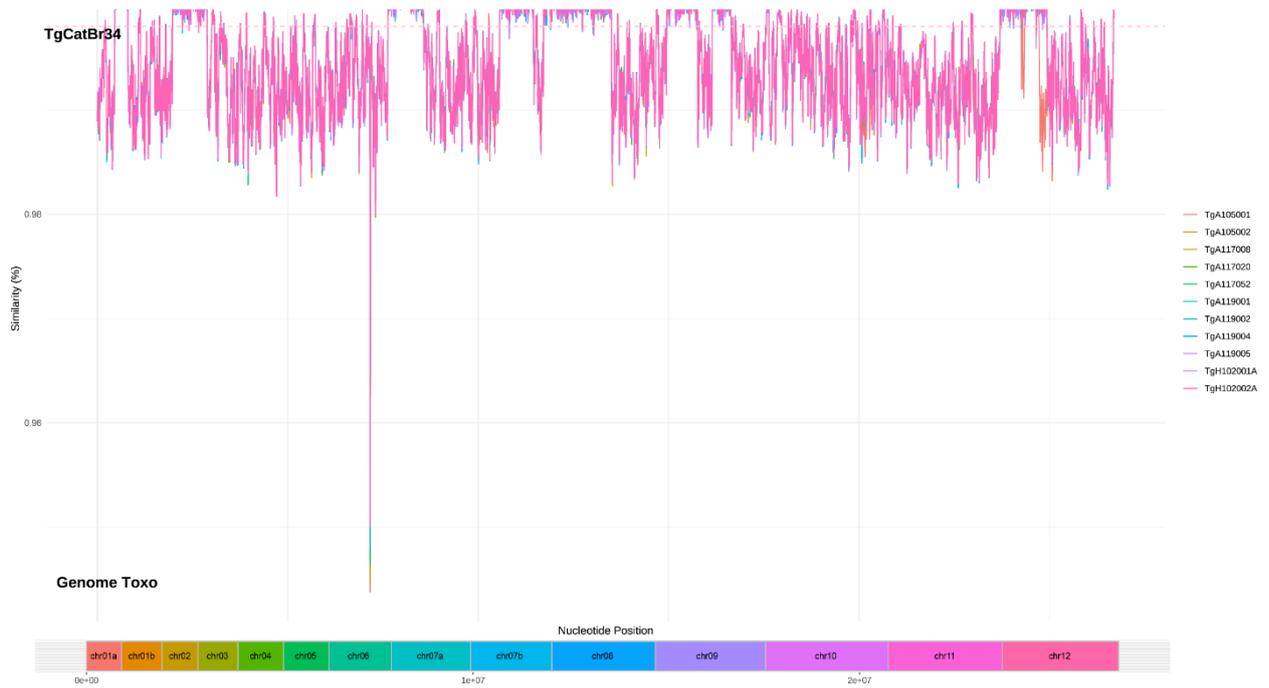


Figure 22 : Comparaison de **TgCatBr34** (référence) aux 11 génomes Africa 1



Figure 23 : Comparaison de **TgCatBr72** (référence) aux 11 génomes Africa 1

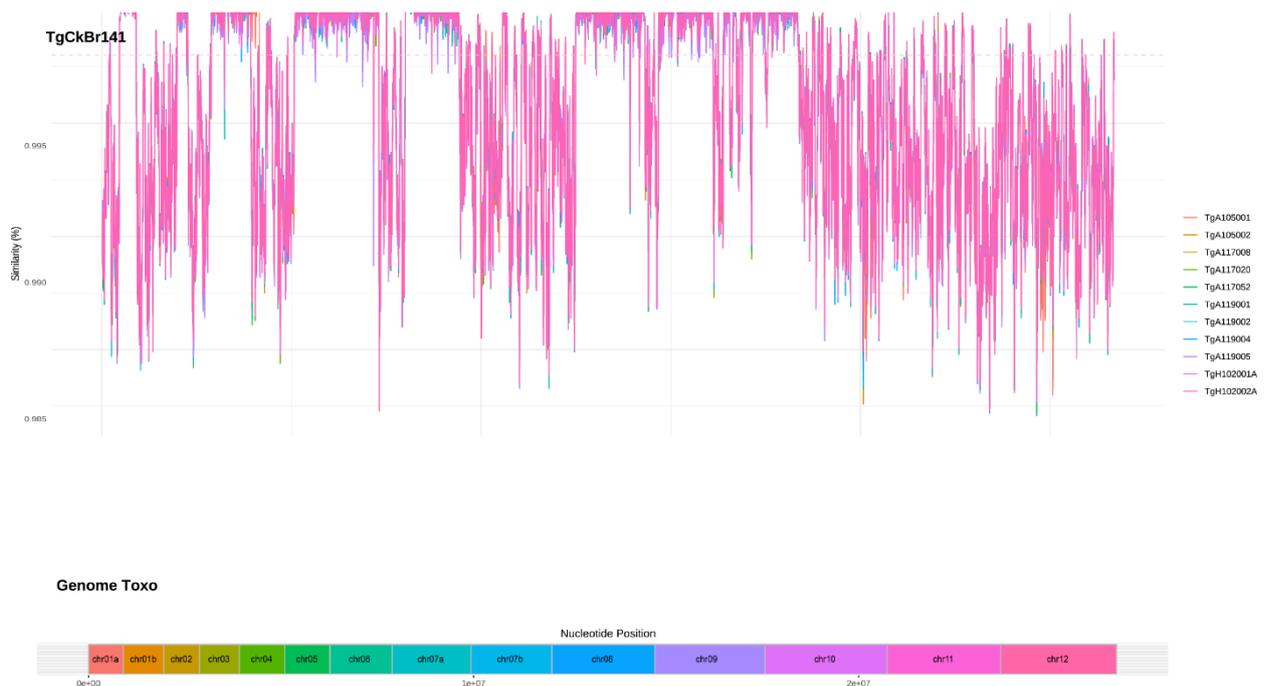


Figure 24 : Comparaison de **TgCkBr141** (référence) aux 11 génomes Africa 1

Chacune des figures ci-dessus montre le pourcentage de similarités de souches Africa 1 pour chaque souche brésilienne (du clade A).

Nous obtenons des résultats différents selon la souche brésilienne mise en référence. Nous pouvons déjà remarquer que les souches africaines semblent être très homogènes entre elles de la Turquie au Bénin (confirmation du caractère clonal de cette lignée largement distribuée à travers l’Afrique), hormis la souche gabonaise TgA105001 (ligne pleine rouge) qui semble avoir des parties de son génome divergentes avec les autres souches Africa 1 (Figures 20, 21, 22 et 23).

Parmi les souches brésiennes, la souche TgCatBr26 semble être celle qui partage le plus d’ADN en commun avec des souches d’Africa 1 (Figure 21), avec un très fort pourcentage de similarités au niveau des chromosomes 1a, 2, 4, 5 et sur toute la zone du chromosome 7b au chromosome 11.

Les deux souches brésiennes qui suivent sont la TgCatBr09 (Figure 20) avec en commun les chromosomes 5, 7b, 8, 10 et 11, puis la TgCatBr72 (Figure 23) avec les chromosomes 1a, 2, 4, 8, 10 à 12.

Ensuite, il y a la souche TgCkBr141 (Figure 24), dont les chromosomes 5, 6, 7a, 8, 9 et 10 sont très similaires à ceux des souches Africa 1, même si pour les trois derniers chromosomes, certaines portions semblent diverger.

Enfin, la souche avec le moins de similarité avec des souches Africa 1 est TgCatBr34 (Figure 22) avec le chromosome 2 et des petites portions du 7a, 7b, 8, 9 et 12 en commun avec des Africa 1.

IV.3.2. Caractérisation de l'origine des chromosomes

Les arbres produits pour chaque chromosome contenant uniquement les zones variables des génomes de la souche brésilienne TgCatBr09 et des souches Africa 1 ont permis de fournir une information plus précise que celle des simPLOTs. La proximité des chromosomes 5, 7b, 10 et 11 de TgCatBr09 avec les mêmes chromosomes Africa 1 est confirmée (Figure 25). En comparaison, la Figure 26 représente un arbre de Neighbor-Joining avec les mêmes souches montrant une plus grande divergence du chromosome 3 de cette souche par rapport aux souches Africa 1. Les arbres pour les autres chromosomes sont sur la Figure 27.

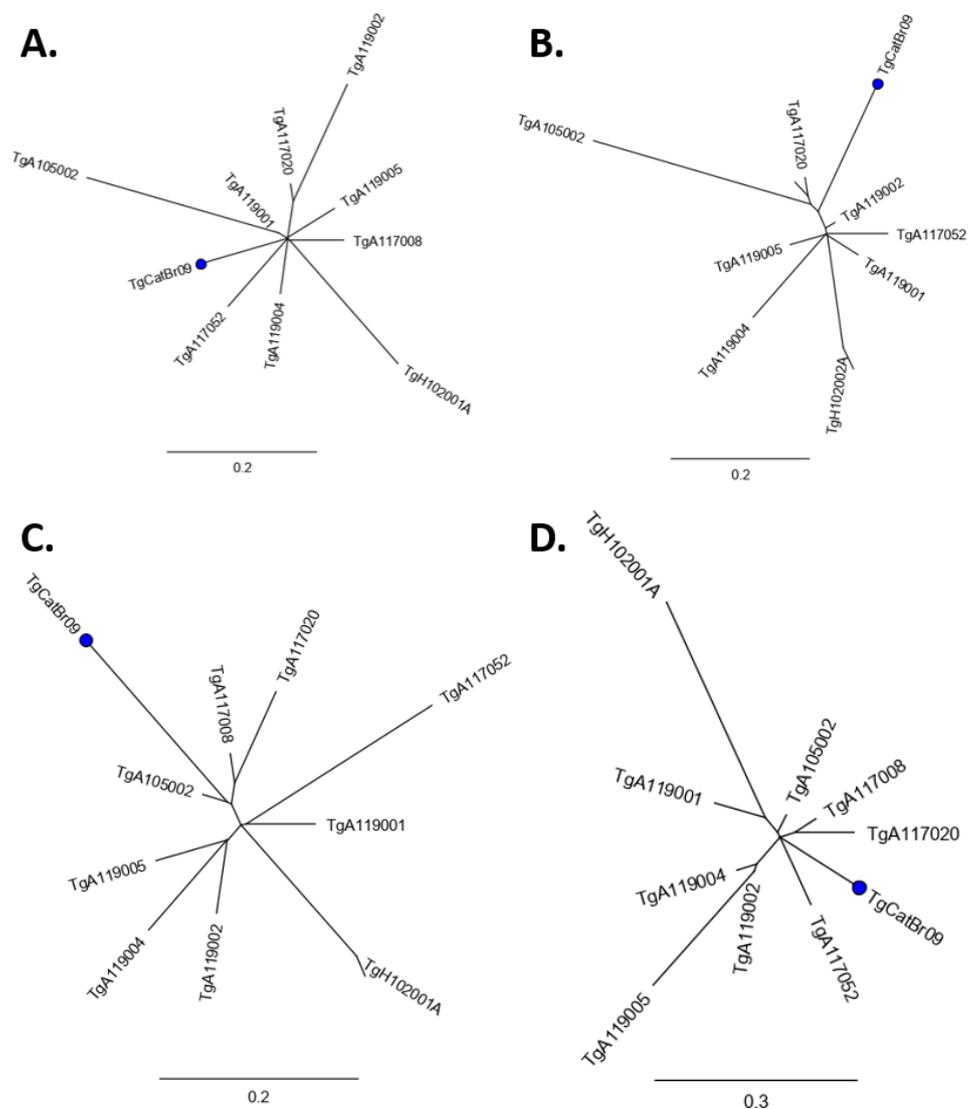


Figure 25 : Arbres de Neighbor-Joining comprenant des souches Africa 1 et la souche brésilienne TgCatBr09 pour **A.** le Chromosome 5, **B.** le Chromosome 7b, **C.** le Chromosome 10 et **D.** le Chromosome 11

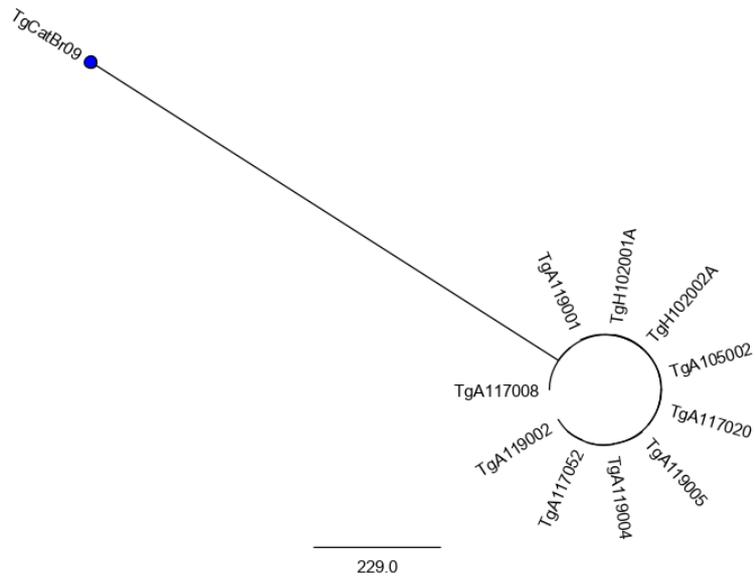


Figure 26 : Arbre de Neighbor-Joining comprenant des souches Africa 1 et la souche brésilienne TgCatBr09 pour le Chromosome 3

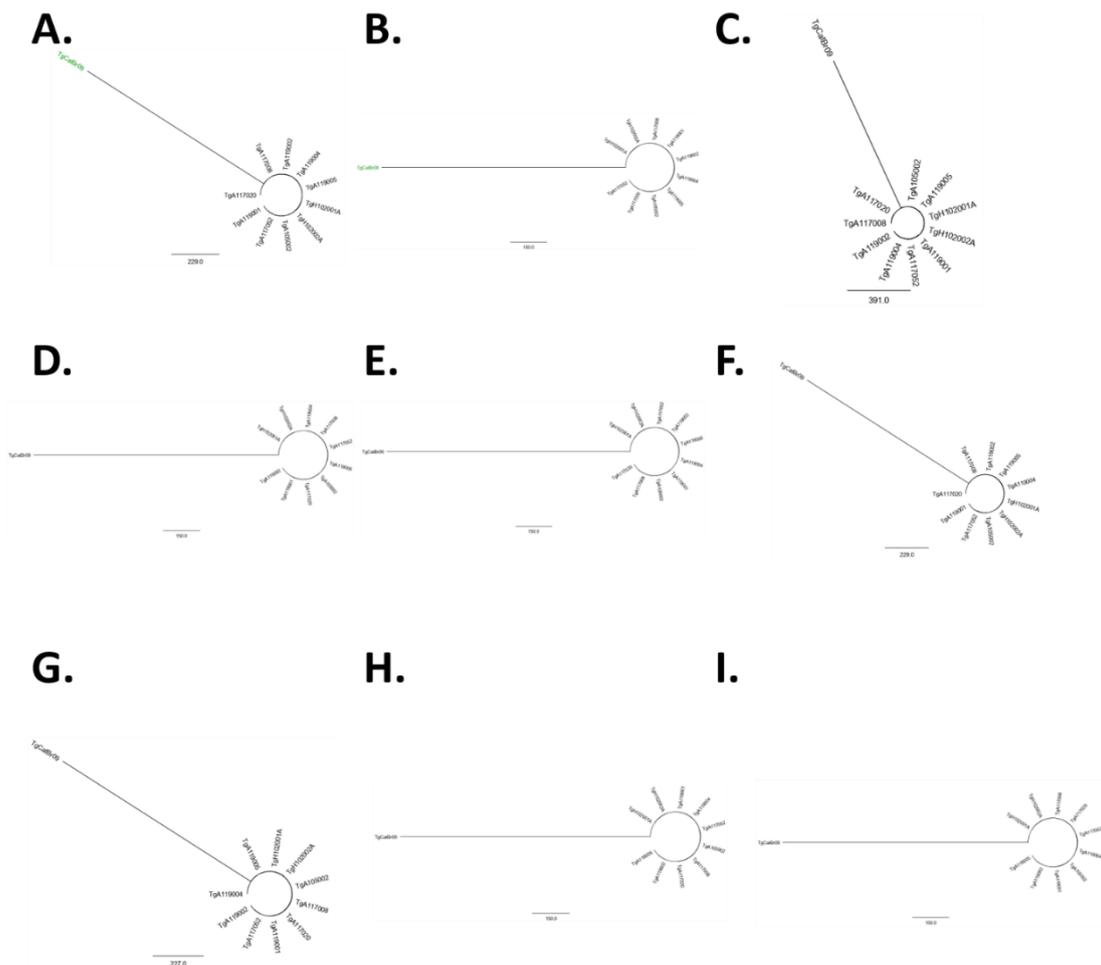


Figure 27 : Arbres de Neighbor-Joining comprenant des souches Africa 1 et la souche brésilienne TgCatBr09 pour le Chromosomes A. 1a, B. 1b, C. 2, D. 4, E. 6, F. 7a, G. 8, H. 9, I. 12

IV.4. Discussion

L'originalité du projet Introtox vient de sa volonté de décrire des phénomènes d'introgessions au niveau du génome entre des souches de *T. gondii* de différentes régions du monde. Ceci pourrait notamment expliquer la virulence de certaines souches, dont le génome serait le résultat d'hybridations entre des souches différentes. Les introgessions et hybridations permettent à de nombreux parasites d'optimiser leur transmission tout en impactant potentiellement l'évolution de leur virulence, la persistance de l'infection, la résistance aux médicaments, les hôtes disponibles ainsi que la manifestation clinique d'une pathologie associée (King et al., 2015). Les nombreux voyages qui se sont déroulés entre l'Europe, l'Afrique et l'Amérique du Sud pendant la période coloniale auraient peut-être rendu possible la rencontre entre des souches éloignées géographiquement, entraînant des recombinaisons. Dans notre cas, nous avons cherché dans un premier temps des similitudes entre des souches Africa 1 du continent africain et des souches brésiliennes classées dans le même clade A par Lorenzi et collaborateurs (2016).

Nous n'avons présenté ici que les résultats pour la souche TgCatBr09 mais les résultats sont en partie extrapolables aux autres souches brésiliennes de ce clade. La proximité entre des souches Africa 1 et des souches du Clade A avait déjà été montrée par Lorenzi et collaborateurs (2016). Pour TgCatBr09 (Clade A et HG 6), au-delà d'une simple proximité, nous avons confirmé que les chromosomes 5, 7b, 10 et 11 sont des chromosomes communs à des souches Africa 1, avec en moyenne seulement 10 SNPs différents (Single Nucleotide Polymorphism). Une des hypothèses du projet Introtox portait sur la possibilité d'introgessions de portions du génome de souches Africa 1 au sein du génome de souches brésiliennes du Clade A résultats d'une importation récente (environ 500 ans) lors de la traite négrière. Même sans datation précise, le peu de variabilité (représentée par le nombre de SNPs différents) entre les souches brésiliennes et Africa 1 sur les chromosomes en commun ne peut suggérer qu'une histoire évolutive récente. Ceci pourrait appuyer l'hypothèse d'importation de souches africaines au Brésil depuis l'Afrique suggérée par de précédentes études (Lehmann et al., 2006; Khan et al., 2007; Mercier et al., 2010), mais le sens reste à prouver. D'ailleurs, dans l'étude de 2010 par Mercier et collaborateurs, une autre lignée africaine uniquement retrouvée au Gabon, l'Africa 3, a été observée proche d'une souche brésilienne en 15 MS. Des analyses analogues à celles faites avec l'Africa 1 sont donc à envisager avec l'Africa 3 et des hypothèses comparables pourront peut-être émerger. En effet, le Gabon est très proche de l'Angola, le pays ayant eu la plus importante traite d'esclaves et de ce fait, le lien le plus fort avec l'Amérique du Sud. Nous pouvons imaginer que cette proximité en 15 MS serait également le résultat d'introgessions.

L'Amérique du Sud semble être le hotspot de la diversité génétique de *T. gondii*, avec pour hypothèse la possibilité d'un grand nombre de recombinaisons permise par une variété inégalée de félinidés (notamment sauvages), mais également d'hôtes intermédiaires associés à un environnement favorable pour le toxoplasme (chaleur et humidité). On y retrouve d'ailleurs des souches de *T. gondii* classées comme « Atypiques », souvent très pathogènes pour l'Homme (Dubey et al., 2007; Carme et al., 2009; Sobanski et al., 2013), dont il serait intéressant d'explorer le génome afin de mieux comprendre leur histoire évolutive et les gènes et mécanismes responsables de cette virulence accrue chez l'Homme. Partant de ce résultat, Bertranpetit et collaborateurs ont proposé que l'origine des lignées actuelles du toxoplasme se situait en Amérique du Sud, pouvant ainsi expliquer ce hotspot de diversité.

Les mécanismes en lien avec la virulence de certaines souches de *T. gondii* sont complexes (Figure 28) et les connaissances encore incomplètes. En revanche, certaines familles d'effecteurs ont déjà été identifiées comme majeures dans ces processus : les ROP (pour Rhoptry Organelle Proteins, de la famille des sérines/thréonines kinases) et les GRA (protéines de Granules Denses). Il en existe plusieurs, les plus connues étant ROP 5 (pseudo-kinase), ROP 16, ROP 18 et GRA 15. Elles sont codées par des gènes sur différents chromosomes : respectivement les chromosomes 12, 7b, 7a et 10 (Saeij et al., 2006; Herrmann et al., 2012; Shastri et al., 2014). Ce sont justement certains de ces chromosomes que nous avons trouvé communs aux souches brésiliennes et aux souches Africa1.

Chez des souches de *T. gondii*, les ROP 5 vont participer à la médiation de l'activité des ROP 18 qui vont phosphoryler les Irgs (immunity-related GTPases), permettant donc la survie des toxoplasmes dans les macrophages activés chez la souris de laboratoire. Les ROP 16 ont pour rôle d'altérer la transcription de gènes par l'hôte et les GRA15 sont des régulateurs de la voie NF- κ B (Sangaré et al., 2019) en agissant sur la production d'IL-12 par les hôtes (Interleukine-12). L'induction de cette interleukine par *T. gondii* a d'ailleurs été associée avec une plus forte virulence chez la souris (Schade and Fischer, 2001).

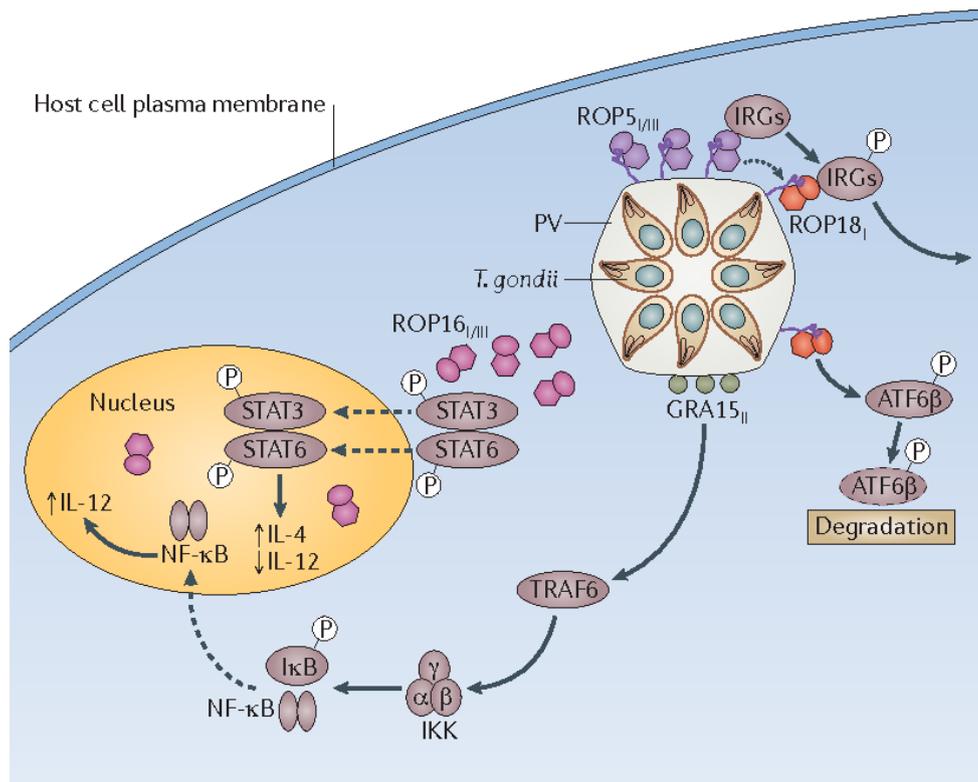


Figure 28 : Signalisation cellulaire des mécanismes impliqués dans la virulence de *T. gondii*

Source : (Hunter et Sibley, 2012)

Chez les souches brésiliennes, les simPLOTs suggèrent que les chromosomes 7b, 8, 9, 10, 11 et 12 sont partagés avec des souches du continent africain et seraient potentiellement d'origine africaine, et nous pouvons imaginer que la virulence de ces souches brésiliennes serait liée à la transmission de caractères génétiques de virulence africains au travers de ces introgressions de chromosomes. Il serait maintenant intéressant d'étudier expérimentalement l'effet des différentes ROP et GRA chez des souches Africa 1 sur la virulence chez un hôte donné. Plusieurs études ont d'ailleurs montré que le ROP 16 de la souche virulente RH (Type I) régulerait les réponses inflammatoires de la rétine lors d'une toxoplasmose oculaire en augmentant la prolifération intraoculaire du parasite et en diminuant la production d'IFN- γ mais seulement lors d'une primo-infection (Rochet et al., 2019; Hernández-de-los-Ríos et al., 2019). L'Amérique du Sud est un continent où la toxoplasmose oculaire chez les immunocompétents représente un problème de santé publique et des cas cliniques similaires ont été décrits dans une moindre mesure en Afrique. La proximité phénotypique des cas entre ces deux régions nous amène à penser que des facteurs de virulence semblables sont en jeu, probablement au sein des chromosomes communs entre l'Africa 1 et les souches brésiliennes. Ce projet de génomique n'étant qu'à ces débuts, il serait intéressant dans le futur de comparer plus précisément les séquences des gènes de virulence mis en cause entre des souches d'origines différentes et de voir s'il existe des proximités entre elles.

En dehors de la virulence, ces observations pourraient aider à élucider l'histoire évolutive récente et ancienne de *T. gondii*. A ce jour, la plus récente étude sur le sujet établissait l'origine ancestrale des lignées actuelles en Amérique du Sud (Bertranpetit et al., 2017) à partir de données microsatellites et séquençage de cinq marqueurs avec un fort polymorphisme (3153 pb par échantillon). Le passage à la génomique avec une plus grande diversité de souches prévu dans le cadre de notre projet viendrait certainement préciser ces histoires évolutives au vu de la plus grande quantité d'informations disponibles.

IV.5. Données complémentaires

L'intégralité des analyses de ce chapitre se sont basées sur les gènes de métabolisme de génomes de souches Africa 1 et de génomes brésiliens du Clade A. Ces résultats sont préliminaires et seront intégrés dans une plus vaste étude, mais le peu de temps disponible entre l'obtention des résultats présentés et la soutenance de cette thèse ne nous a pas permis d'explorer davantage de génomes.

Cependant, nous avons tout de même cherché à voir si en intégrant la totalité du génome nos observations sur TgCatBr09 seraient similaires. Pour cela, nous avons comparé des souches Type II, Type III, Amazonian et Africa 1 à l'aide du logiciel Ancestry HMM puis du package karyoploteR sous R 4.0.2 (<https://cran.r-project.org/>) pour représenter les différentes portions du génome de TgCatBr09 matchant avec les souches de comparaison (Figure 29). Cette analyse se base sur la recherche de populations ancestrales locales à partir d'estimations du nombre de copies d'une population particulière à un site donné (LAI pour « Local Ancestry Inference », en opposition au « Global Ancestry Inference » qui estime la contribution de chaque population avec des proportions globales) (Thornton et Bermejo, 2014). Ces résultats confirment nos précédents résultats obtenus pour les chromosomes 5, 7b, 10 et 11, mais des portions Africa 1 sont retrouvés sur d'autres chromosomes. Il semblerait également que cette souche brésilienne soit un mélange de Type III, Amazonian et Africa 1 sur la majorité des chromosomes. Pour les hybridations avec le Type III, cela pourrait être expliqué par son côté cosmopolite, et les portions Amazonian par la proximité géographique. Enfin, nous pouvons nous questionner sur l'origine des portions de Type II retrouvés sur les chromosomes 4 et 8, le type II étant quasi absent en Amérique du Sud (Shwab et al., 2014). Serait-ce là encore une preuve d'introgessions (e.g. importations de Type II européen ayant transité en Afrique ou bien de souches recombinante Type II-africaine) en lien avec la traite négrière ?

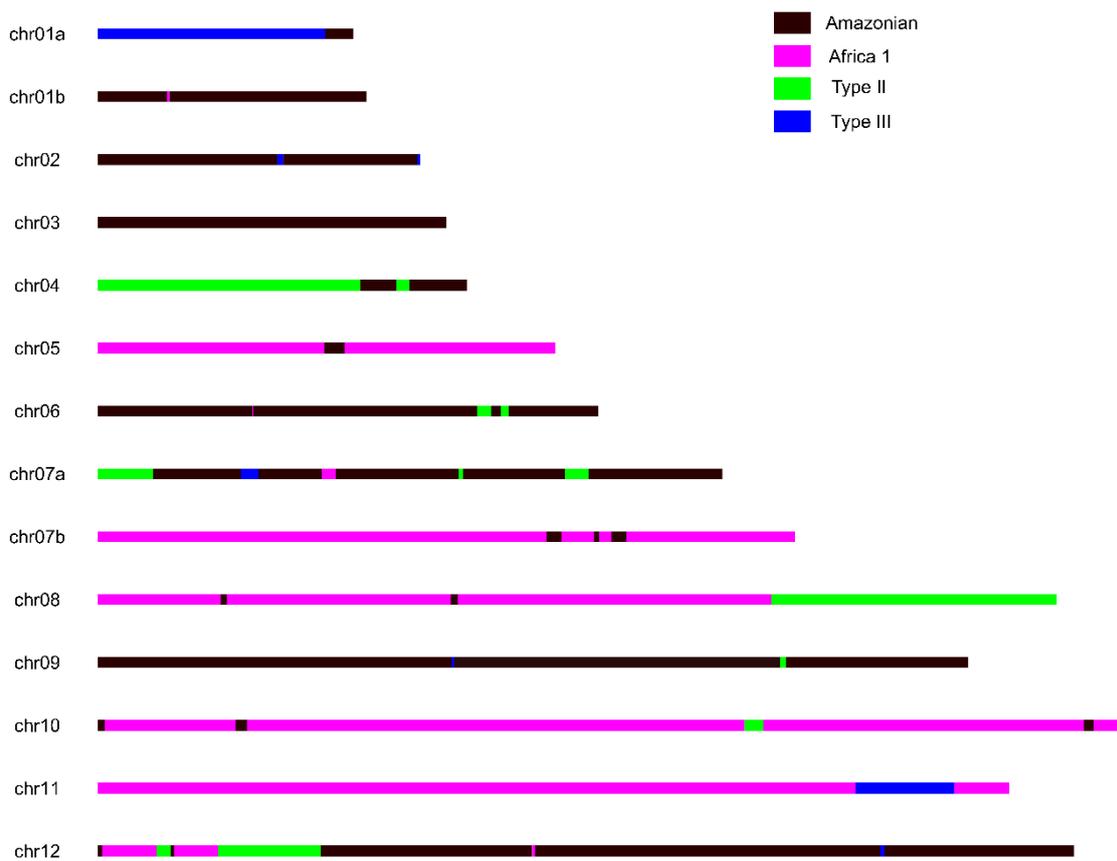


Figure 29 : Comparaison par chromosomes du génome entier de TgCatBr09 à des souches classées Amazonian, Africa 1, Type II et Type III

Il serait intéressant de reproduire ces analyses en changeant la souche de référence afin de voir sur différents génomes les régions communes entre différentes lignées. Notamment, la forte prédominance de souches Africa 1 retrouvée au Bénin via les microsatellites cache peut-être des portions de Type II importés d'Europe non détectables avec cette technique.

Chapitre V. Discussion générale et perspectives

Cette thèse est la combinaison d'une investigation de terrain, de manipulations en laboratoire et d'analyses génétiques et statistiques des résultats obtenus afin de décrire la diversité génétique de *T. gondii* au Bénin, l'un des trois pays africains inclus dans le Projet Introtox, à partir d'échantillons animaux. Elle fait suite à des travaux réalisés au Gabon (Mercier et al., 2010) et au Sénégal (Galal et al., 2019) avec un protocole similaire. Nos hypothèses et résultats attendus avant la réalisation de ces missions prévoyaient une diversité intermédiaire entre celle retrouvée au Sénégal et celle du Gabon avec la possibilité de génotypes européens introduits sur la côte. Mais nos conclusions ont été tout autres, avec une prédominance du génotype autochtone Africa 1 hautement virulent pour la souris de laboratoire. Pourtant le Bénin a eu une histoire coloniale similaire à celle du Sénégal et des événements d'invasions biologiques similaires en rapport avec leur histoire y ont probablement eu lieu. Dans ce chapitre, nous allons dans un premier temps discuter des forces et limites de notre travail, tout d'abord d'un point de vue de la méthodologie, puis des avancées et perspectives de chacune des études.

V.1. Méthodologie

V.1.1. Les enjeux et contraintes d'une mission de terrain en zone tropicale humide

Sans travail de terrain en zone tropicale, la diversité génétique de *T. gondii* serait probablement toujours restreinte aux trois grands archétypes I, II et III et leurs recombinants. Il est donc primordial de continuer à échantillonner dans ces zones, d'autant plus qu'elles sont souvent le foyer de formes graves de toxoplasmose chez l'Homme.

Mais ce genre de mission demande une lourde organisation, autant administrative que logistique. Par exemple, pour la réalisation de notre protocole, l'isolement de souches doit se faire sur modèle expérimental murin et nécessite donc une infrastructure de type animalerie. D'après la littérature et notre expérience, le choix de la variété de souris de laboratoire est également très important et dans notre cas, nous avons dû importer des souris Swiss sur Cotonou depuis un fournisseur européen et les mettre en reproduction sur place. Ceci a demandé des infrastructures spécifiques qu'il a fallu équiper par nous mêmes, nécessitant de nombreuses autorisations, souvent créées pour l'occasion car sans précédent dans le pays.

En plus de l'accord des autorités administratives (autorisations d'importation, d'exportation, comité d'éthique, protocole de Nagoya etc.), un grand travail de sensibilisation au niveau des autorités locales (chef de village ou de quartier) est essentiel pour avoir accès aux animaux, qui sont souvent destinés à la consommation personnelle. Mais l'accueil a toujours été

chaleureux et les propriétaires enthousiastes lorsque la problématique était clairement expliquée.

L'autre contrainte de notre protocole dans le cadre d'une mission est la nécessité de prélèvements frais, pour maximiser les chances d'isolement et ceci dans un contexte environnemental chaud et humide. Or en travaillant dans des zones reculées, il est impératif de prendre en compte les fréquentes coupures de courant voire absence d'électricité ou de réfrigérateur disponible, afin de préserver l'intégrité des échantillons. Sachant que le rendement d'isolement n'est pas de 100% même dans des conditions optimales, tous les prélèvements sont particulièrement précieux. Pour réduire au maximum ce problème, nous avons choisi de nous focaliser sur les volailles, considérées comme bioindicateurs de présence du toxoplasme dans un environnement donné (Galal et al., 2019a). Elles présentent également l'avantage d'être relativement fréquentes quelque soit le site d'échantillonnage et facilement acquérables. De cette façon, nous achetions aux propriétaires les animaux séropositifs qui nous intéressaient pour l'isolement et nous les ramenions au laboratoire de l'EPAC pour les euthanasier au dernier moment avant l'inoculation à trois souris par échantillon. Malgré cela, il y a tout de même eu de la mortalité chez les souris en raison notamment d'infections bactériennes après inoculation, malgré un traitement antibiotique (gentamycine et streptomycine) des prélèvements.

Après isolement des souches sur les souris de laboratoire, il a fallu les stocker à -80°C et au bout des six mois de mission les envoyer en France en carboglace. De nouvelles autorisations ont été nécessaires et notamment un Protocole de Nagoya à ratifier. Depuis 2010, ce protocole permet aux états d'être souverains sur leurs ressources génétiques et les connaissances traditionnelles des populations locales et autochtones sur ces ressources. Dans notre cas, un accord APA (Accès aux ressources génétiques et Partage des Avantages issues de leur utilisation) non commercial a été évalué et accepté par le point focal du Bénin (Services des Eaux et Forêts) avec comme avantage, la copropriété des droits de propriété intellectuelle, le partage des résultats de la recherche, la collaboration, la coopération et la contribution aux programmes de recherche scientifique, à l'éducation et à la formation, et le transfert des connaissances et technologies à nos partenaires béninois. Il est important aujourd'hui de reconnaître l'origine d'échantillons prélevés lors de mission à l'étranger tels que les nôtres et de lutter contre la biopiraterie.

V.1.2. Les forces et limites de notre protocole

V.1.2.1. L'échantillonnage des volailles domestiques

Avec plus de 700 volailles testées dans quatre grandes villes du Bénin et leurs alentours, l'étude de terrain semble réunir tous les critères de représentativité, en essayant de couvrir

une zone la plus vaste possible. Dans le Chapitre II, nous avons ciblé les volailles domestiques élevées en plein air qui sont connues pour être de bons bio-indicateurs des souches de *T. gondii* circulant dans un environnement donné (Dubey et al., 2016). Au Bénin, l'élevage traditionnel est très répandu et il est normal pour une famille habitant même dans le centre-ville de Cotonou de posséder une dizaine de poules. De plus, il est rare d'observer des formes sévères de toxoplasmose chez ces animaux (Dubey et al., 2002), contrairement à d'autres animaux de rente, ce qui empêche le biais de sélection de certains génotypes non-virulents. Nous pouvons dire que notre protocole est optimisé afin d'avoir un maximum de chance d'isoler des souches : poules en liberté, pas de prélèvements sur animaux trop jeunes (moins de trois mois), screening sérologique en amont (la sérologie MAT étant reconnue pour être fiable chez les poules (Yan et al., 2010)). Cependant, il nous est arrivé de ne pas pouvoir acheter les poules séropositives car elles couvaient ou avaient des poussins. Nous avons également dû parfois sélectionner raisonnablement le nombre d'animaux achetés afin d'éviter de piller le cheptel des propriétaires et d'isoler des clones pour un même site. Au final, nous avons échantillonné 758 volailles pour 119 animaux séropositifs, 69 ont pu être achetées pour l'isolement et 45 souches ont été obtenues (rendement d'environ 65%).

V.1.2.2. L'échantillonnage des rongeurs sauvages

Les rongeurs sont un élément essentiel du cycle de transmission de *T. gondii*, étant la proie privilégiée des chats en milieux domestique et péri-domestique. Pour l'étude présentée dans le Chapitre III, les captures avaient été réalisées (avec notre participation ponctuelle) et stockées par des collaborateurs. Nous avons profité des organes isolés pour faire de la détection d'ADN et du génotypage dit « direct » (sans isolement de souche). Une première stratégie similaire à celle faite pour les volailles (Chapitre II) impliquait une sérologie en amont puis de cibler les animaux séropositifs. Nos résultats nous ont vite amené à abandonner cette méthode, en raison de fortes discordances pour nous concentrer sur la qPCR. Nos résultats sont venus appuyer les observations de Galal et collaborateurs en 2019 en les étendant à de nouvelles espèces de rongeurs et remettre en question une grande partie des études de séroprévalence chez les rongeurs sauvages.

En raison de la crise sanitaire COVID-19, ce travail a pris énormément de retard et pour cette thèse seule la moitié des échantillons ont pu être analysés (de nouvelles données seront probablement disponibles pour la soutenance). Le génotypage était tenté lorsque la quantité d'ADN était suffisamment élevée ($Ct \leq 32$). Au total, 331 individus ont été testés (au moment de l'écriture de cette thèse) pour 55 positifs en qPCR et le génotypage n'a été possible sur un minimum de dix marqueurs que dans quatre cas. En fait, les charges parasitaires évaluées d'après le cycle de quantification en qPCR étaient souvent très tranchées : soit fortement positives (environ 29Ct) soit très faiblement positives (entre 36 et 38Ct). Parmi les échantillons

génotypables, nous n'avions retrouvé que de l'Africa 1, ce qui fait écho à notre étude sur les souches isolées de volailles et vient compléter les discussions sur cette prédominance d'un type hautement virulent chez la souris de laboratoire sur tout le territoire béninois. Cependant, il est maintenant nécessaire de tester ces hypothèses sur différentes populations de rongeurs sauvages (invasifs et autochtones) avec différentes souches (virulentes et avirulentes sur souris de laboratoire).

V.1.2.3. Limites de ces échantillonnages

Tous les animaux échantillonnés pour ces travaux l'ont été dans un environnement anthropisé voire domestique, et les souches de *T. gondii* isolées à partir de ces prélèvements peuvent donc être caractérisées de souches domestiques. Il est connu que la diversité génétique du parasite au sein de la faune sauvage est différente de celle de la faune domestique (Mercier et al., 2011; Khan et al., 2014; Jiang et al., 2018). Pour ce qui est de la diversité du toxoplasme dans l'environnement sauvage en Afrique, tout reste à faire puisque jamais aucune souche n'a pu y être isolée. Pour les travaux du Chapitre II, nous avons essayé de nous rapprocher de la réserve naturelle du Parc de la Pendjari au maximum en échantillonnant dans des villages alentours mais sans résultat (prévalence nulle chez les volailles). Nous, ainsi que Jonas Etougbéché, un étudiant de l'EPAC, avons entamé des collaborations avec des responsables du parc en espérant pouvoir profiter à l'avenir d'échantillons issus de chasses officielles mais aussi d'échantillons d'excréments de félinés. Mais les premiers échantillons obtenus par M. Etougbéché étaient négatifs et le terrorisme qui sévit à la frontière entre le Burkina Faso et le Bénin, au milieu de la Pendjari, l'a obligé à être rapatrié sur Cotonou, ceci rendant de nouveaux échantillonnages impossibles pour le moment. Ces précieux échantillons de *T. gondii* issus de la faune sauvage pourraient être le chaînon manquant d'une certaine histoire évolutive du parasite dans cette région.

V.1.2.4. L'utilisation des souris SWISS dans le protocole d'isolement

La souris SWISS est utilisée dans de nombreux laboratoires pour l'isolement de *T. gondii* car particulièrement sensible à l'infection. Le rendement d'isolement de 65% obtenu lors de ma mission au Bénin est similaire aux précédentes études au Sénégal et Gabon. Mais les 35% restant pourraient peut-être cacher une diversité plus importante.

Nous allons prendre exemple sur la manière dont nous avons obtenu le génotype Africa 4 variant TUB 2 (var. TUB 2). Tout d'abord, ce génotype est à ce jour rarement retrouvé dans le monde, avec en dehors du Bénin, une description au Mali, au Ghana et au Sénégal seulement. Cet échantillon provient d'un village au Nord du Bénin à la frontière avec le Togo : Boukoubé. Ce village était difficilement accessible à l'époque, bien qu'une route goudronnée fut en cours de construction. Nous y avons acheté trois animaux séropositifs pour l'isolement du parasite.

Sur ces trois isollements, deux semblaient avoir abouti avec des souris séropositives au bout de quatre semaines de protocole et donc sans aucune virulence. La recherche de kystes dans le cerveau a cependant été infructueuse sur tous ces échantillons. Ce n'est qu'une fois de retour en France que la qPCR a indiqué la présence d'ADN de *T. gondii*, mais en faible quantité, ce qui est assez surprenant sachant que l'isolement sur la souris SWISS amène généralement à l'amplification de la charge parasitaire. Finalement, ce génotype n'a pu être obtenu qu'à partir d'ADN extrait du digestat initial et la souche a été perdue en tentant de la repasser sur des souris SWISS.

Compte-tenu des difficultés d'isolement de ce génotype chez la souris SWISS, il n'est pas exclu que sa présence ait été sous-estimée dans certaines études. Pour y remédier, il serait intéressant d'isoler le parasite sur des souris immunodéprimées, mais ceci demanderait une logistique particulière afin d'éviter des contaminations additionnelles, ce qui semble très compliqué à mettre en place sur le terrain. Une autre option serait de cryogéniser du digestat et de le réinoculer à des souris immunodéprimées dans un environnement plus stable. Mais encore une fois, ce ne garantit pas l'isolement de la souche car il y a toujours une perte de parasites lors de la cryogénéisation.

V.1.3. Limites des microsatellites

Depuis 2010, les marqueurs microsatellites sont utilisés en routine afin de classier des souches de *T. gondii* (Ajzenberg et al., 2010). Plus précise que de précédentes techniques telles que la PCR-RFLP, elle permet de distinguer des lignées à partir de huit marqueurs MS peu polymorphes, mais aussi d'identifier des différences intra-lignées à partir de sept marqueurs MS très polymorphes. Les marqueurs utilisés représentent au total entre 3000 et 3800 pb non codantes du génome en fonction des souches, et donc une petite portion des 65Mb du génome total de *T. gondii*. Nous l'avons vu dans le chapitre IV, le génome de *T. gondii* peut contenir des introgressions venant de lignées différentes et peut-être que la diversité génétique observée au Bénin n'est pas 100% africaine comme pourrait le suggérer les microsatellites. Il est même très probable qu'elle ait été tout autant influencée qu'au Sénégal mais que cela ne serait pas visible par la technique 15 MS.

V.2. La structuration de la diversité génétique du toxoplasme au Bénin et dans le monde : avancées et perspectives

La diversité génétique de *T. gondii* en Afrique se dessine peu à peu. Notre étude est la première à décrire cette diversité au Bénin avec l'isolement de 39 souches et plusieurs autres génotypes : un clone de Type III et un Africa 4 var. TUB2. Plus de 92% des génotypes étaient des Africa 1, ce qui est en contraste total avec les études faites au Gabon (Mercier et al., 2010) et surtout au Sénégal (Galal et al., 2019a) avec des protocoles similaires. En particulier,

l'absence de Type II au Bénin et la prédominance de l'Africa 1 vient en questionner la ou les raisons.

Cette distribution écrasante de l'Africa 1 sur l'ensemble du territoire béninois et le peu de génotypes différents retrouvés ne permettent pas de distinguer des séparations claires entre régions. Seul l'Africa 4 var. TUB 2 pourrait être considéré comme particulier car venant d'une zone très difficile d'accès et qui pourrait être un génotype plus grandement distribué dans d'autres pays d'Afrique de l'Ouest.

Il faut aussi noter que des clones de deux souches environnementales Africa 1 de Cotonou ont été isolées chez une femme enceinte et un patient immunodéprimé au Danemark (Jokelainen et al., 2018). Il est très peu probable qu'ils se soient infectés au Danemark mais les dossiers médicaux ne permettaient pas d'attester d'une origine africaine des patients ou d'un voyage récent.

V.2.1. Le rôle de la souris domestique dans le cycle de *Toxoplasma gondii* et sur sa diversité

L'Africa 1 est une souche hautement virulente pour la souris de laboratoire (Mercier et al., 2010; Galal et al., 2019a; Hamidović et al., accepté dans PLOS Neg) et c'est ce génotype qui a été retrouvée en grande majorité sur l'ensemble du territoire béninois. Nous avons alors repris l'hypothèse de Galal et collaborateurs pour expliquer, à l'inverse du Sénégal, l'absence de Type II par l'absence de souris domestiques au Bénin. Cette explication est supportée par l'échantillonnage de micromammifères dans Cotonou, où la souris domestique a uniquement été retrouvée dans l'enceinte du Port commercial de Cotonou, mais également par une précédente étude au Bénin et au Niger (Hima et al., 2019). En revanche, les autres espèces invasives *R. rattus* et *R. norvegicus* ont bien réussi à s'implanter dans différents quartiers, ce qui pourrait être expliqué par leur plus grande résistance que la souris à des génotypes virulents de toxoplasme.

En connaissance des mécanismes de résistance aux souches virulentes (IRG) présents chez la moitié des souris béninoises, la seule piste de l'Africa 1 empêchant son expansion ne tient pas. Il y a sûrement d'autres facteurs, différents entre le Sénégal et le Bénin, qui entrent en jeu.

V.3. Perspectives de travail

V.3.1. Etudes expérimentales

Cette thèse s'inscrit dans la continuité directe de deux précédents projets au Gabon et au Sénégal. Bien que ce travail de thèse soit similaire dans la construction du plan d'échantillonnage à ces précédentes études, les résultats observés, notamment la faible

diversité de lignées de *T. gondii* au Bénin, mettent à jour de nouvelles hypothèses et discussions. L'exploration de la diversité génétique de *T. gondii* devrait dans le futur évoluer vers une validation (ou non) des hypothèses liées à la virulence chez les hôtes du parasite, notamment les rongeurs autochtones et invasifs en Afrique. Un collaborateur béninois, Jonas R. Etougbétché base d'ailleurs ses travaux de thèse sur l'étude de la virulence de différentes souches de *T. gondii* (Type II, Type III, Africa 1) chez différents rongeurs sauvages mis en reproduction sur plusieurs générations. Ses résultats viendront probablement répondre à nos différentes interrogations sur les mécanismes immunitaires chez ces hôtes et leur manière de réagir à une infection par le toxoplasme.

V.3.2. Etudes de terrain

L'autre volet à explorer est celui de la clinique de la toxoplasmose humaine en Afrique en lien avec les souches circulantes (et leur génotype) sur le continent. Au Bénin, notre équipe travaille déjà en collaboration avec des partenaires béninois (Richard Amagbégnon, du CHU-MEL) et l'UMR MERIT (Paris-Descartes) afin d'évaluer le taux de toxoplasmose congénitale (avec le même protocole diagnostique et prise en charge qu'en France) et tenter d'isoler des souches impliquées dans des toxoplasmoses congénitales. Pour compléter ce volet humain, il serait également intéressant d'orienter les projets de recherche sur les toxoplasmoses oculaires et les toxoplasmoses sévères qui, bien que moins fréquentes qu'en Amérique du Sud, seraient également liées au génotype de la souche infectante.

V.3.3. Stratégies pour la suite des études en génomique

La crise sanitaire actuelle a énormément ralenti les recherches sur ce volet du projet Introtox. Avec le Chapitre IV de la thèse, nous avons donc plutôt la volonté d'initier les discussions sur l'influence des échanges entre l'Afrique et l'Amérique du Sud sur le génome de *T. gondii*. Nous avons mis en évidence des introgressions de chromosomes typiquement Africa 1 chez les souches brésiliennes, avec potentiellement un impact sur la virulence de ces souches. Mais d'autres souches, classées dans différentes lignées, seront dans un futur proche intégrées dans une étude comprenant une centaine de nouveaux génomes. A partir de là, énormément d'analyses pourront être faites : phylogénie, datation, chromosome painting, mais aussi des études plus ciblées sur les gènes de virulence. En ce qui concerne les résultats de cette thèse, les analyses seront complétées en ajoutant de nouvelles lignées en comparaison, notamment pour la construction des arbres par chromosomes (supposés out-groups).

La prochaine étape serait de réussir à faire une datation du génome de *T. gondii* et notre laboratoire y travaille déjà. Pendant une trentaine d'années, le CRB Toxoplasma a réalisé des passages de la souche RH tous les trois jours sur des souris SWISS, ce qui correspond à environ 4680 passages sur toute la période. La souche RH d'il y a 30 ans (conservée

congelée) et la souche RH actuelle ont été séquencées, et bien que la profondeur ne soit pas homogène, 26 000 000 pb pour chacun des séquençages ont pu être comparés. Il a été retrouvé 371 SNPs différents sur ces deux échantillons séparés par 4680 passages, amenant à un pas mutational de 3×10^{-9} . Mais ce nombre de passage en laboratoire est très largement supérieur à ce qui pourrait être observé dans la nature. Bien que la durée d'un cycle soit inconnue dans la nature, il a pu être estimé à six mois par Lokman Galal en prenant en compte la biologie des hôtes importants dans le cycle de *T. gondii* : les rongeurs. Dans la nature, une souris a une espérance de vie d'environ six mois, ce qui représente le temps qu'elle aurait de s'infecter de son vivant et de se faire chasser par un félin qui serait à son tour infecté, soit un cycle 15 fois plus que ce qui serait observé en laboratoire (ce qui reviendrait à cinq passages par an dans la nature).

Avec ces informations nous obtenons la formule suivante :

$$\text{Nb de années séparant deux souches} = \frac{(\text{nb de SNPs différents} \times 4680) / 371}{5}$$

Nous avons calculé ce nombre d'années entre un génome Africa 1 et le génome de la souche brésilienne TgCatBr09 (8 SNPs différents sur 1 171 000 pb, soit 177 sur 26 000 000 pb).

Bien que cette formule reste à optimiser, il y aurait 446 ans séparant l'Africa 1 échantillonné en Afrique en 2018 et la souche brésilienne : l'introduction de l'Africa 1 au Brésil aurait donc potentiellement eu lieu en 1572, un peu après le tout début de la traite négrière en 1501.

Références bibliographiques

Littérature scientifique

- Abu, E. K., J. Nyarko Boampong, J. Kwame Amoabeng, A. A. Ilechie, S. Kyei, A. Owusu-Ansah, S. Bert Boadi-Kusi, B. Amoani, and I. Ayi. 2016. "Epidemiology of Ocular Toxoplasmosis in Three Community Surveys in the Central Region of Ghana, West Africa." *Ophthalmic Epidemiology* 23 (1): 14–19. <https://doi.org/10.3109/09286586.2015.1089579>.
- Ajzenberg, D., A. L. Bañuls, M. Tibayrenc, and M.-L. Dardé. 2002. "Microsatellite Analysis of *Toxoplasma gondii* Shows Considerable Polymorphism Structured into Two Main Clonal Groups." *International Journal for Parasitology* 32 (1): 27–38. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(01\)00301-0](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(01)00301-0).
- Ajzenberg, D., A. Dumètre, and M.-L. Dardé. 2005. "Multiplex PCR for Typing Strains of *Toxoplasma gondii*." *Journal of Clinical Microbiology* 43 (4): 1940–43. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.4.1940-1943.2005>.
- Ajzenberg, D., F. Collinet, A. Mercier, P. Vignoles, and M.-L. Dardé. 2010. "Genotyping of *Toxoplasma gondii* Isolates with 15 Microsatellite Markers in a Single Multiplex PCR Assay." *Journal of Clinical Microbiology* 48 (12): 4641–45. <https://doi.org/10.1128/JCM.01152-10>.
- Aki, T. M., P. A. Assoumou, E. Anyunzoghe, I. Mistoul, M. Vouma, S. Mekyna, and E. Mve Mengome. 2019. "Profil Des Lésions Ophtalmologiques Au Cours de l'Infection à VIH/SIDA à Libreville." *HEALTH SCIENCES AND DISEASE* 20 (6 S1). <http://www.hsd-fmsb.org/index.php/hsd/article/view/1741>.
- Amin, R. M., M. Goweida, A. Bedda, A. Kamel, and A. Radwan. 2019. "Clinical Patterns and Causes of Intraocular Inflammation in a Uveitis Patient Cohort from Egypt." *Ocular Immunology and Inflammation* 27 (6): 859–67. <https://doi.org/10.1080/09273948.2016.1236972>.
- Aroussi, A., P. Vignoles, F. Dalmay, L. Wimel, M.-L. Dardé, A. Mercier, and D. Ajzenberg. 2015. "Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in Horse Meat from Supermarkets in France and Performance Evaluation of Two Serological Tests." *Parasite* 22. <https://doi.org/10.1051/parasite/2015014>.
- Audoin-Rouzeau, F., and J.-D. Vigne. 1998. "Le rat noir (*Rattus rattus*) en Europe antique et médiévale : les voies du commerce et l'expansion de la peste", in KOKABI M. & WAHL J. (éds), Actes du 7ème colloque de l'International Council for Archaeozoology, Constance, septembre 1994. *Anthropozoologica* 25-26: 399-404.
- Austen, R. A. 2010. "Trans-Saharan Africa in World History". *Oxford University Press*.
- Balasundaram, M. B., R. Andavar, M. Palaniswamy, and N. Venkatapathy. 2010. "Outbreak of Acquired Ocular Toxoplasmosis Involving 248 Patients." *Archives of Ophthalmology* 128 (1): 28. <https://doi.org/10.1001/archophthalmol.2009.354>.
- Basso, W., R. Edelhofer, W. Zenker, K. Möstl, A. Kübber-Heiss, and H. Prosl. 2005. "Toxoplasmosis in Pallas' Cats (*Otocolobus Manul*) Raised in Captivity." *Parasitology* 130 (3): 293–99. <https://doi.org/10.1017/S0031182004006584>.

- Beck, H. E., N. E. Zimmermann, T. R. McVicar, N. Vergopolan, A. Berg, and E. F. Wood. 2018. "Present and Future Köppen-Geiger Climate Classification Maps at 1-Km Resolution." *Scientific Data* 5 (1): 180214. <https://doi.org/10.1038/sdata.2018.214>.
- Beltrame, A., S. Venturini, G. Crichiutti, V. Meroni, D. Buonfrate, and M. Bassetti. 2016. "Recurrent Seizures during Acute Acquired Toxoplasmosis in an Immunocompetent Traveller Returning from Africa." *Infection* 44 (2): 259–62. <https://doi.org/10.1007/s15010-015-0821-7>.
- Berthélémy, S. 2014. "Toxoplasmose et grossesse." *Actualités Pharmaceutiques* 53 (541): 43–45. <https://doi.org/10.1016/j.actpha.2014.10.009>.
- Bertranpetit, E., T. Jombart, E. Paradis, H. F. J. Pena, J. P. Dubey, C. Su, A. Mercier, S. Devillard, and D. Ajzenberg. 2017. "Phylogeography of *Toxoplasma gondii* Points to a South American Origin." *Infection, Genetics and Evolution* 48 (March): 150–55. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.12.020>.
- Bettioli, S. S., D. L. Obendorf, M. Nowarkowski, T. Milstein, and J. M. Goldsmid. 2000. "Earthworms as Paratenic Hosts of Toxoplasmosis in Eastern Barred Bandicoots in Tasmania." *Journal of Wildlife Diseases* 36 (1): 145–48. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-36.1.145>.
- Bolais, P. F., P. Vignoles, P. F. Pereira, R. Keim, A. Aroussi, K. Ismail, M.-L. Dardé, M. R. Amendoeira, and A. Mercier. 2017. "*Toxoplasma gondii* Survey in Cats from Two Environments of the City of Rio de Janeiro, Brazil by Modified Agglutination Test on Sera and Filter-Paper." *Parasites & Vectors* 10 (1): 88. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2017-8>.
- Brouat, C., C. A. Diagne, K. Ismaïl, A. Aroussi, A. Dalecky, K. Bâ, M. Kane, et al. 2018. "Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Commensal Rodents Sampled across Senegal, West Africa." *Parasite* 25. Accessed October 26, 2020. <https://doi.org/10.1051/parasite/2018036>.
- Brown, M., M. R. Lappin, J. L. Brown, B. Munkhtsog, and W. F. Swanson. 2005. "Exploring the Ecologic Basis for Extreme Susceptibility of Pallas' Cats (*Otocolobus manul*) to Fatal Toxoplasmosis." *Journal of Wildlife Diseases* 41 (4): 691–700. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-41.4.691>.
- Cañón-Franco, W. A., N. López-Orozco, J. E. Gómez-Marín, and J. P. Dubey. 2014. "An Overview of Seventy Years of Research (1944 – 2014) on Toxoplasmosis in Colombia, South America." *Parasites & Vectors* 7 (1): 427. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-427>.
- Carme, B., M. Demar, D. Ajzenberg, and M.-L. Dardé. 2009. "Severe Acquired Toxoplasmosis Caused by Wild Cycle of *Toxoplasma gondii*, French Guiana." *Emerging Infectious Diseases* 15 (4): 656–58. <https://doi.org/10.3201/eid1504.081306>.
- Churchfield, S., P. Barrière, R. Hutterer, and M. Colyn. 2004. "First Results on the Feeding Ecology of Sympatric Shrews (Insectivora: *Soricidae*) in the Tai National Park, Ivory Coast." *Acta Theriologica* 49 (April): 1–15. <https://doi.org/10.1007/BF03192504>.

- Clausnitzer, V., S. Churchfield, and R. Hutterer. 2003. "Habitat Occurrence and Feeding Ecology of *Crocidura montis* and *Lophuromys flavopunctatus* on Mt. Elgon, Uganda." *African Journal of Ecology* 41 (1): 1–8. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2028.2003.00386.x>.
- Conférence à Ouidah, Unesco. 2001. "From Chains to Bonds: The Slave Trade Revisited". *Berghahn Books*.
- Cristina, N., M. F. Liaud, F. Santoro, B. Oury, and P. Ambroise-Thomas. 1991. "A Family of Repeated DNA Sequences in *Toxoplasma gondii*: Cloning, Sequence Analysis, and Use in Strain Characterization." *Experimental Parasitology* 73 (1): 73–81. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(91\)90009-l](https://doi.org/10.1016/0014-4894(91)90009-l).
- Cristina, N., B. Oury, P. Ambroise-Thomas, and F. Santoro. 1991. "Restriction-Fragment-Length Polymorphisms among *Toxoplasma gondii* Strains." *Parasitology Research* 77 (3): 266–68. <https://doi.org/10.1007/bf00930870>.
- Dalecky, A., K. Bâ, S. Piry, C. Lippens, C. A. Diagne, M. Kane, A. Sow, et al. 2015. "Range Expansion of the Invasive House Mouse *Mus musculus domesticus* in Senegal, West Africa: A Synthesis of Trapping Data over Three Decades, 1983-2014: Range Expansion of the House Mouse in Senegal." *Mammal Review* 45 (3): 176–90. <https://doi.org/10.1111/mam.12043>.
- Dao, A., B. Fortier, M. Soete, F. Plenat, and J.-F. Dubremetz. 2001. "Successful Reinfection of Chronically Infected Mice by a Different *Toxoplasma gondii* Genotype." *International Journal for Parasitology* 31 (1): 63–65. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00151-X](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00151-X).
- Dardé, M.-L., B. Bouteille, and M. Pestre-Alexandre. 1988. "Isoenzymic Characterization of Seven Strains of *Toxoplasma gondii* by Isoelectrofocusing in Polyacrylamide Gels." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 39 (6): 551–58. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1988.39.551>.
- Dardé, M.-L., B. Bouteille, and M. Pestre-Alexandre. 1992. "Isoenzyme Analysis of 35 *Toxoplasma gondii* Isolates and the Biological and Epidemiological Implications." *The Journal of Parasitology* 78 (5): 786. <https://doi.org/10.2307/3283305>.
- Dardé, M.-L. 2008. "*Toxoplasma gondii*, 'New' Genotypes and Virulence." *Parasite* 15 (3): 366–71. <https://doi.org/10.1051/parasite/2008153366>.
- Dardé, M.-L., A. Mercier, C. Su, A. Khan, and M. E. Grigg. 2020. "Molecular Epidemiology and Population Structure of *Toxoplasma gondii*." In *Toxoplasma gondii (Third Edition)*, 63–116. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815041-2.00003-7>.
- Demar, M., D. Ajzenberg, D. Maubon, F. Djossou, D. Panchoe, W. Punwasi, N. Valery, et al. 2007. "Fatal Outbreak of Human Toxoplasmosis along the Maroni River: Epidemiological, Clinical, and Parasitological Aspects." *Clinical Infectious Diseases* 45 (7): e88–95. <https://doi.org/10.1086/521246>.
- Dietz, H. H., P. Henriksen, V. Bille-Hansen, and S. A. Henriksen. 1997. "Toxoplasmosis in a Colony of New World Monkeys." *Veterinary Parasitology* 68 (4): 299–304. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(96\)01088-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(96)01088-6).
- Dubey, J. P. 1995. "Duration of Immunity to Shedding of *Toxoplasma gondii* Oocysts by Cats." *The Journal of Parasitology* 81 (3): 410. <https://doi.org/10.2307/3283823>.

- Dubey, J. P. 2010. *Toxoplasmosis of Animals and Humans*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press.
- Dubey, J. P., and F. L. Welcome. 1988. "Toxoplasma gondii-Induced Abortion in Sheep." *Journal of the American Veterinary Medical Association* 193 (6): 697–700.
- Dubey, J. P., A. P. Gendron-Fitzpatrick, Andrea L. Lenhard, and D. Bowman. 1988. "Fatal Toxoplasmosis and Enteroepithelial Stages of *Toxoplasma gondii* in a Pallas Cat (*Felis Manul*)1." *The Journal of Protozoology* 35 (4): 528–30. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1988.tb04144.x>.
- Dubey, J. P., C. A. Brown, J. L. Carpenter, and J. J. Moore. 1992. "Fatal Toxoplasmosis in Domestic Rabbits in the USA." *Veterinary Parasitology* 44 (3): 305–9. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(92\)90127-U](https://doi.org/10.1016/0304-4017(92)90127-U).
- Dubey, J. P., S. K. Shen, O. C. H. Kwok, and P. Thulliez. 1997. "Toxoplasmosis in Rats (*Rattus norvegicus*): Congenital Transmission to First and Second Generation Offspring and Isolation of *Toxoplasma gondii* from Seronegative Rats." *Parasitology* 115 (1): 9–14. <https://doi.org/10.1017/S0031182097008950>.
- Dubey, J. P., D. H. Graham, C. R. Blackston, T. Lehmann, S. M. Gennari, A. M. A. Ragozo, S. M. Nishi, et al. 2002. "Biological and Genetic Characterisation of *Toxoplasma gondii* Isolates from Chickens (*Gallus domesticus*) from São Paulo, Brazil: Unexpected Findings." *International Journal for Parasitology* 32 (1): 99–105.
- Dubey, J. P., S. M. Gennari, N. Sundar, M. C. B. Vianna, L. M. Bandini, L. E. O. Yai, O. C. H. Kwok, and C. Su. 2007. "Diverse and atypical genotypes identified in *Toxoplasma gondii* from dogs in São Paulo, Brazil." *Journal of Parasitology* 93 (1): 60–64. <https://doi.org/10.1645/GE-972R.1>.
- Dubey, J. P. 2008. "The History of *Toxoplasma gondii*—The First 100 Years." *Journal of Eukaryotic Microbiology* 55 (6): 467–75. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2008.00345.x>.
- Dubey, J. P. 2009. "Toxoplasmosis in Sheep—The Last 20 Years." *Veterinary Parasitology* 163 (1–2): 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.02.026>.
- Elbez-Rubinstein, A., D. Ajzenberg, M.-L. Dardé, R. Cohen, A. Dumètre, H. Yera, E. Gondon, J.-C. Janaud, and P. Thulliez. 2009. "Congenital Toxoplasmosis and Reinfection during Pregnancy: Case Report, Strain Characterization, Experimental Model of Reinfection, and Review." *The Journal of Infectious Diseases* 199 (2): 280–85. <https://doi.org/10.1086/595793>.
- El-Nawawi, F. A., M. A. Tawfik, and R. M. Shaapan. 2008. "Methods for Inactivation of *Toxoplasma gondii* Cysts in Meat and Tissues of Experimentally Infected Sheep." *Foodborne Pathogens and Disease* 5 (5): 687–90. <https://doi.org/10.1089/fpd.2007.0060>.
- Epiphanyo, S, I. L. Sinhorini, and J. L. Catão-Dias. 2003. "Pathology of Toxoplasmosis in Captive New World Primates." *Journal of Comparative Pathology* 129 (2): 196–204. [https://doi.org/10.1016/S0021-9975\(03\)00035-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9975(03)00035-5).

- Epiphanio, S., Marcelo A. B. V. Guimarães, D. L. Fedullo, S. H. R. Correa, and J.é L. Catão-Dias. 2000. "Toxoplasmosis in golden-headed lion tamarins (*Leontopithecus chrysomelas*) and emperor marmosets (*Saguinus imperator*) in captivity." *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 31 (2): 231–35. [https://doi.org/10.1638/1042-7260\(2000\)031\[0231:TIGHLT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1638/1042-7260(2000)031[0231:TIGHLT]2.0.CO;2).
- Ferreira, A. M., M. S. Martins, and R.W.A. Vitor. 2001. "Virulence for BALB/c Mice and Antigenic Diversity of Eight *Toxoplasma gondii* Strains Isolated from Animals and Humans in Brazil." *Parasite* 8 (2): 99–105. <https://doi.org/10.1051/parasite/2001082099>.
- Fujii, H., T. Kamiyama, and T. Hagiwara. 1983. "Species and Strain Differences in Sensitivity to *Toxoplasma* Infection among Laboratory Rodents." *Japanese Journal of Medical Science & Biology* 36 (6): 343–46. <https://doi.org/10.7883/yoken1952.36.343>.
- Furtado, J. M., K. L. Winthrop, N. J. Butler, and J. R. Smith. 2013. "Ocular Toxoplasmosis I: Parasitology, Epidemiology and Public Health." *Clinical & Experimental Ophthalmology* 41 (1): 82–94. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9071.2012.02821.x>.
- Gaballah, E., A. Abdel-Magied, N. Aboufotouh, and G. Elganainy. 2018. "Chronic Infection with *Toxoplasma gondii* Does Not Prevent Acute Disease after Virulent Strain Reinfection in Experimental Mice." *Parasitologists United Journal* 11 (3): 149–54. <https://doi.org/10.21608/puj.2018.5547.1021>.
- Gachet, B., A. Elbaz, A. Boucher, O. Robineau, E. Fréalle, F. Ajana, P.-Y. Delannoy, et al. 2018. "Acute Toxoplasmosis in an Immunocompetent Traveller to Senegal." *Journal of Travel Medicine* 25 (1). <https://doi.org/10.1093/jtm/tay086>.
- Galal, L., D. Ajzenberg, A. Hamidović, M.-F. Durieux, M.-L. Dardé, and A. Mercier. 2018. "Toxoplasma and Africa: One Parasite, Two Opposite Population Structures." *Trends in Parasitology* 34 (2): 140–54. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.10.010>.
- Galal, L., A. Sarr, T. Cuny, C. Brouat, Fa. Coulibaly, M. Sembène, M. Diagne, M. Diallo, A. Sow, A. Hamidović, N. Plault, M.-L. Dardé, D. Ajzenberg, and A. Mercier. 2019a. "The Introduction of New Hosts with Human Trade Shapes the Extant Distribution of *Toxoplasma gondii* Lineages." *PLOS Neglected Tropical Diseases* 13 (7): e0007435. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007435>.
- Galal, L., A. Hamidović, M.-L. Dardé, and A. Mercier. 2019b. "Diversity of *Toxoplasma gondii* Strains at the Global Level and Its Determinants." *Food and Waterborne Parasitology* 15 (June): e00052. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2019.e00052>.
- Galal, L., G. Schares, C. Stragier, P. Vignoles, C. Brouat, T. Cuny, C. Dubois, T. Rohart, C. Glodas, M.-L. Dardé, M. Kane, Y. Niang, M. Diallo, A. Sow, D. Aubert, A. Hamidović, D. Ajzenberg, A. Mercier. 2019c. "Diversity of *Toxoplasma gondii* Strains Shaped by Commensal Communities of Small Mammals." *International Journal for Parasitology* 49 (3–4): 267–75. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.11.004>.
- Gilbert, R. E., and H. Jackson. 1995. "Incidence of Acute Symptomatic *Toxoplasma* Retinochoroiditis in South London According to Country of Birth" *The BMJ*. <https://doi.org/10.1136/bmj.310.6986.1037>.

- Glasner, P. D., C. Silveira, D. Kruszon-Moran, M. C. Martins, M. Burnier, S. Silveira, M. E. Camargo, R. B. Nussenblatt, R. A. Kaslow, and R. Belfort. 1992. "An Unusually High Prevalence of Ocular Toxoplasmosis in Southern Brazil." *American Journal of Ophthalmology* 114 (2): 136–44. [https://doi.org/10.1016/S0002-9394\(14\)73976-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9394(14)73976-5).
- Granjon, L., and J.-M. Duplantier. 2009. "Les rongeurs de l'Afrique sahélo-soudanienne," *IRD Editions/MNHN Collection Faune et flore tropicale*.
- Grigg, M. E., J. Ganatra, J. C. Boothroyd, and T. P. Margolis. 2001. "Unusual Abundance of Atypical Strains Associated with Human Ocular Toxoplasmosis." *Journal of Infectious Diseases* 184 (5): 633–639.
- GEPMA. 2015. "Identification des micromammifères capturés ou trouvés morts - Guide pour la saisie des données sur faune-alsace." <http://files.biolovision.net/www.faune-alsace.org/userfiles/gepma/MicroMamm/clemicromamv1a20150329.pdf>
- Halonen, S. K., and L. M. Weiss. 2013. "Chapter 8 - Toxoplasmosis." *Handbook of Clinical Neurology* 114: 125–45. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53490-3.00008-X>.
- Hamidović, A., J. R. Etougbéché, A. B. N. Tonouhewa, L. Galal, G. Dobigny, G. Houémènou, H. Da Zoclanclounon, R. Amagbégnon, A. Laleye, N. Fievet, S. Piry, K. Berthier, H. F. J. Pena, M.-L. Dardé, A. Mercier. accepté. "A hotspot of *Toxoplasma gondii* Africa 1 lineage in Benin: How new genotypes from West Africa contribute to understand the parasite genetic diversity worldwide." *PLoS Neglected Tropical Diseases*. doi en cours de création
- Harb, O. S., J. C. Kissinger, and D. S. Roos. 2020. "Chapter 23 - ToxoDB: The Functional Genomic Resource for *Toxoplasma* and Related Organisms**On Behalf of the EuPathDB Group." In *Toxoplasma gondii (Third Edition)*, 1021–41. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815041-2.00023-2>.
- Harrison, M. 2012. "Contagion: How Commerce Has Spread Disease". *Yale University Press*.
- Hassan, M. A., A.-A. Olijnik, E.-M. Frickel, and J. P. Saeij. 2019. "Clonal and Atypical *Toxoplasma* Strain Differences in Virulence Vary with Mouse Sub-Species." *International Journal for Parasitology* 49 (1): 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.08.007>.
- Hernández-de-los-Ríos, A., M. Murillo-Leon, L. E. Mantilla-Muriel, A. Farid Arenas, M. Vargas-Montes, N. Cardona, A. de-la-Torre, J. C. Sepúlveda-Arias, and J. E. Gómez-Marín. 2019. "Influence of Two Major *Toxoplasma gondii* Virulence Factors (ROP16 and ROP18) on the Immune Response of Peripheral Blood Mononuclear Cells to Human Toxoplasmosis Infection." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 9. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00413>.
- Herrmann, D. C., A. Bärwald, A. Maksimov, N. Pantchev, M. G. Vrhovec, F. J. Conraths, and G. Schares. 2012. "*Toxoplasma gondii* Sexual Cross in a Single Naturally Infected Feline Host: Generation of Highly Mouse-Virulent and Avirulent Clones, Genotypically Different from Clonal Types I, II and III." *Veterinary Research* 43 (April): 39. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-43-39>.

- Hima, K., G. Houémenou, S. Badou, M. Garba, H.-J. Dossou, J. R. Etougbétché, P. Gauthier, E. Artige, O. Fossati-Gaschignard, S. Gagaré, G. Dobigny, and A. Dalecky. 2019. "Native and Invasive Small Mammals in Urban Habitats along the Commercial Axis Connecting Benin and Niger, West Africa." *Diversity* 11 (12): 238. <https://doi.org/10.3390/d11120238>.
- Howe, D. K., and L. D. Sibley. 1995. "Toxoplasma gondii Comprises Three Clonal Lineages: Correlation of Parasite Genotype with Human Disease." *Journal of Infectious Diseases* 172 (6): 1561–1566.
- Hunter, C. A., and L. D. Sibley. 2012. "Modulation of Innate Immunity by *Toxoplasma gondii* Virulence Effectors." *Nature Reviews. Microbiology* 10 (11): 766–78. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2858>.
- Ibrahim Ouali, S. 2020. "Diversité génétique de *Toxoplasma gondii* : une cartographie de la distribution mondiale des génotypes du parasite." Mémoire de Master Santé Publique. Université de Limoges
- Jiang, T., E. K. Shwab, R. M. Martin, R. W. Gerhold, B. n M. Rosenthal, J. P. Dubey, and C. i Su. 2018. "A Partition of *Toxoplasma gondii* Genotypes across Spatial Gradients and among Host Species, and Decreased Parasite Diversity towards Areas of Human Settlement in North America." *International Journal for Parasitology* 48 (8): 611–19. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.01.008>.
- Jokelainen, P., M. Isomursu, A. Näreaho, and A. Oksanen. 2011. "Natural *Toxoplasma gondii* Infections in European Brown Hares and Mountain Hares in Finland: Proportional Mortality Rate, Antibody Prevalence, and Genetic Characterization." *Journal of Wildlife Diseases* 47 (1): 154–63. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-47.1.154>.
- Jokelainen, P., J.-B. Murat, and H. V. Nielsen. 2018. "Direct Genetic Characterization of *Toxoplasma gondii* from Clinical Samples from Denmark: Not Only Genotypes II and III." *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology* 37 (3): 579–86. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-3152-z>.
- Khan, A., B. Fux, C. Su, J. P. Dubey, M. L. Darde, J. W. Ajioka, B. M. Rosenthal, and L. D. Sibley. 2007. "Recent Transcontinental Sweep of *Toxoplasma gondii* Driven by a Single Monomorphic Chromosome." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (37): 14872–77. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702356104>.
- Khan, A., D. Ajzenberg, A. Mercier, M. Demar, S. Simon, M.-L. Dardé, Q. Wang, S. Kumar Verma, B. M. Rosenthal, J. P. Dubey, and L. D. Sibley. 2014. "Geographic Separation of Domestic and Wild Strains of *Toxoplasma gondii* in French Guiana Correlates with a Monomorphic Version of Chromosome1a." *PLOS Neglected Tropical Diseases* 8 (9): e3182. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003182>.
- Khan, A., S. Taylor, J. W. Ajioka, B. M. Rosenthal, and L. D. Sibley. 2009. "Selection at a Single Locus Leads to Widespread Expansion of *Toxoplasma gondii* Lineages That Are Virulent in Mice." *PLOS Genetics* 5 (3). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000404>.

- Khan, Asis, S.a Taylor, C. Su, A. J. Mackey, J. Boyle, R. Cole, D. Glover, K. Tang, I. T. Paulsen, M. Berriman, J. C. Boothroyd, E. R. Pfefferkorn, J. P. Dubey, J. W. Ajioka, D. S. Roos, J. C. Wootton, and L. D. Sibley. 2005. "Composite Genome Map and Recombination Parameters Derived from Three Archetypal Lineages of *Toxoplasma gondii*." *Nucleic Acids Research* 33 (9): 2980–92. <https://doi.org/10.1093/nar/gki604>.
- Kim, K., and L. M. Weiss. 2004. "*Toxoplasma gondii*: The Model Apicomplexan." *International Journal for Parasitology*, The Seventh International Congress on Toxoplasmosis, 34 (3): 423–32. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2003.12.009>.
- King, K. C., R. B. Stelkens, J. P. Webster, D. F. Smith, and M. A. Brockhurst. 2015. "Hybridization in Parasites: Consequences for Adaptive Evolution, Pathogenesis, and Public Health in a Changing World." *PLOS Pathogens* 11 (9): e1005098. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005098>.
- Lecompte, E., L. Granjon, J. K. Peterhans, and C. Denys. 2002. "Cytochrome B-Based Phylogeny of the *Praomys* Group (Rodentia, *Murinae*): A New African Radiation?" *Comptes Rendus Biologies* 325 (7): 827–40. [https://doi.org/10.1016/S1631-0691\(02\)01488-9](https://doi.org/10.1016/S1631-0691(02)01488-9).
- Lehmann, T., P. L. Marcet, D. H. Graham, E. R. Dahl, and J. P. Dubey. 2006. "Globalization and the Population Structure of *Toxoplasma gondii*." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (30): 11423–28. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601438103>.
- Leroy, J., S. Houzé, M.-L. Dardé, H. Yéra, B. Rossi, L. Delhaes, F. Gabriel, P. Loubet, A.-S. Deleplancque, E. Senneville, F. Ajana, B. Sendid, and D. Malvy. 2019. "Severe Toxoplasmosis Imported from Tropical Africa in Immunocompetent Patients: A Case Series." *Travel Medicine and Infectious Disease*, November, 101509. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2019.101509>.
- Lewden, C., Y. J. Drabo, D. M. Zannou, M. Y. Maiga, D. K. Minta, P. S. Sow, J. Akakpo, F. Dabis, S. P. Eholié, and The IeDEA West Africa Collaboration. 2014. "Disease Patterns and Causes of Death of Hospitalized HIV-Positive Adults in West Africa: A Multicountry Survey in the Antiretroviral Treatment Era." *Journal of the International AIDS Society* 17 (1): 18797. doi: 10.7448/IAS.17.1.18797.
- Lilue, J., U. B. Müller, T. Steinfeldt, and J. C. Howard. 2013. "Reciprocal Virulence and Resistance Polymorphism in the Relationship between *Toxoplasma gondii* and the House Mouse." *ELife* 2: e01298. <https://doi.org/10.7554/eLife.01298>.
- Lippens, C., A. Estoup, M. K. Hima, A. Loiseau, C. Tatard, A. Dalecky, K. Bâ, M. Kane, M. Diallo, A. Sow, Y. Niang, S. Piry, K. Berthier, R. Leblois, J.-M. Duplantier, and C. Brouat. 2017. "Genetic Structure and Invasion History of the House Mouse (*Mus musculus domesticus*) in Senegal, West Africa: A Legacy of Colonial and Contemporary Times." *Heredity* 119 (2): 64–75. <https://doi.org/10.1038/hdy.2017.18>.

- Lorenzi, H., A. Khan, M. S. Behnke, S. Namasivayam, L. S. Swapna, M. Hadjithomas, S. Karamycheva, D. Pinney, B. P. Brunk, J. W. Ajioka, D. Ajzenberg, J. C. Boothroyd, J. P. Boyle, M.-L. Dardé, M. A. Diaz-Miranda, J. P. Dubey, H. M. Fritz, S. M. Gennari, B. D. Gregory, K. Kim, J. P. J. Saeij, C. Su, M.I W. White, X.-Q. Zhu, D. K. Howe, B. M. Rosenthal, M. E. Grigg, J. Parkinson, L. Liu, J. C. Kissinger, D. S. Roos & L. D. Sibley. 2016. "Local Admixture of Amplified and Diversified Secreted Pathogenesis Determinants Shapes Mosaic *Toxoplasma gondii* Genomes." *Nature Communications* 7 (January): 10147. <https://doi.org/10.1038/ncomms10147>.
- McHugh, M. L. 2012. "Interrater Reliability: The Kappa Statistic." *Biochemia Medica* 22 (3): 276–82.
- Mercier, A., S. Devillard, B. Ngoubangoye, H. Bonnabau, A.-L. Bañuls, P. Durand, B. Salle, D. Ajzenberg, and M.-L. Dardé. 2010. "Additional Haplogroups of *Toxoplasma gondii* out of Africa: Population Structure and Mouse-Virulence of Strains from Gabon." Edited by Maria Yazdanbakhsh. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 4 (11): e876. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000876>.
- Mercier, A., D. Ajzenberg, S. Devillard, M. Demar, B. De Thoisy, H. Bonnabau, F. Collinet, R. Boukhari, D. Blanchet, S. Simon, B. Carne, and M.-L. Dardé. 2011. "Human Impact on Genetic Diversity of *Toxoplasma gondii*: Example of the Anthropized Environment from French Guiana." *Infection, Genetics and Evolution* 11 (6): 1378–1387.
- Mercier, A., M. Garba, H. Bonnabau, M. Kane, J.-P. Rossi, M.-L. Dardé, G. Dobigny. 2013. "Toxoplasmosis Seroprevalence in Urban Rodents: A Survey in Niamey, Niger." *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 108 (4): 399–407. <https://doi.org/10.1590/S0074-0276108042013002>.
- Miller, J. C. 1981. "Mortality in the Atlantic Slave Trade: Statistical Evidence on Causality." *The Journal of Interdisciplinary History* 11 (3): 385–423. <https://doi.org/10.2307/203625>.
- Montoya, J. G., and O. Liesenfeld. 2004. "Toxoplasmosis." *The Lancet* 363: 1965–76.
- Morrison, D. A. 2005. "How Old Are the Extant Lineages of *Toxoplasma gondii*?" *Parassitologia*. 47(2):205-14. PMID: 16252475..
- Müller, U. B., and J. C. Howard. 2016. "The Impact of *Toxoplasma gondii* on the Mammalian Genome." *Current Opinion in Microbiology*, Host-microbe interactions: parasites/fungi/viruses, 32 (August): 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.04.009>.
- Murillo-León, M., U. B. Müller, I. Zimmermann, S. Singh, P. Widdershooven, C. Campos, C. Alvarez, S. Könen-Waisman, N. Lukes, Z. Ruzsics, J. C. Howard, M. Schwemmler, and T. Steinfeldt. 2019. "Molecular Mechanism for the Control of Virulent *Toxoplasma gondii* Infections in Wild-Derived Mice." *Nature Communications* 10 (1): 1233. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09200-2>.
- Murphy, R. G., R. H. Williams, J. M. Hughes, G. Hide, N. J. Ford, and D. J. Oldbury. 2008. "The Urban House Mouse (*Mus domesticus*) as a Reservoir of Infection for the Human Parasite *Toxoplasma gondii*: An Unrecognised Public Health Issue?" *International Journal of Environmental Health Research* 18 (3): 177–85. <https://doi.org/10.1080/09603120701540856>.

- Nicolas, V., M. Gerbault-Seureau, A. Delapre, and B. Bed'Hom. 2020. "Small Mammal Inventory in the Lama Forest Reserve (South Benin), with New Cytogenetical Data." *Journal of Vertebrate Biology* 69 (2): 20009.1. <https://doi.org/10.25225/jvb.20009>.
- Nicolle, C., and L. Manceaux. 1908. "Sur Une Infection à Corps de Leishman (Ou Organismes Voisins) Du Gondi." *CR Acad Sci* 147 (763).
- Nsiangani-Lusambo, N., and D. Kaimbo Wa Kaimbo. 2019. "Profil clinique et épidémiologique de la toxoplasmose oculaire à Kinshasa." *Journal Français d'Ophtalmologie* 42 (8): 900–906. <https://doi.org/10.1016/j.jfo.2019.05.017>.
- Pappas, G., N. Roussos, and M. E. Falagas. 2009. "Toxoplasmosis Snapshots: Global Status of *Toxoplasma gondii* Seroprevalence and Implications for Pregnancy and Congenital Toxoplasmosis." *International Journal for Parasitology* 39 (12): 1385–94. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.04.003>.
- Petersen, E., A. Kijlstra, and M. Stanford. 2012. "Epidemiology of Ocular Toxoplasmosis." *Ocular Immunology and Inflammation* 20 (2): 68–75. <https://doi.org/10.3109/09273948.2012.661115>.
- Pétre-Grenouilleau O. 2005. "Les Traités négrières. Essai d'histoire globale., 2004." *Dix-Huitième Siècle* 37 (1): 715–16.
- Pfaff, A. W., A. de-la-Torre, E. Rochet, J. Brunet, M. Sabou, A. Sauer, T. Bourcier, J. E. Gomez-Marín, and E. Candolfi. 2014. "New Clinical and Experimental Insights into Old World and Neotropical Ocular Toxoplasmosis." *International Journal for Parasitology*, 12th International Congress on Toxoplasmosis, 44 (2): 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.09.007>.
- Pomares, C., D. Ajzenberg, L. Bornard, G. Bernardin, L. Hasseine, M.-L. Dardé, and P. Marty. 2011. "Toxoplasmosis and Horse Meat, France." *Emerging Infectious Diseases* 17 (7): 1327–28. <https://doi.org/10.3201/eid1707.101642>.
- Puckett, E. E., J. Park, M.w Combs, M.I J. Blum, J. E. Bryant, A. Caccone, F. Costa, E. E. Deinum, A. Esther, C. G. Himsworth, P. D. Keightley, A. Ko, Å. Lundkvist, L. M. McElhinney, S. Morand, J. Robins, J. Russell, T. M. Strand, O. Suarez, L. Yon, and J. Munshi-South. 2016. "Global Population Divergence and Admixture of the Brown Rat (*Rattus norvegicus*)." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 283 (1841): 20161762. <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.1762>.
- Rautenbach, W., J. Steffen, D. Smit, K. Lecuona, and T. Esterhuizen. 2019. "Patterns of Uveitis at Two University-Based Referral Centres in Cape Town, South Africa." *Ocular Immunology and Inflammation* 27 (6): 868–74. <https://doi.org/10.1080/09273948.2017.1391954>.
- Richardson, D., and D. Eltis. 2015. "Atlas of the Transatlantic Slave Trade." *Lewis Walpole Series in Eighteenth-Century Culture and History*, February. <https://hull-repository.worktribe.com/output/369724>.
- Robert-Gangneux, F., and M.-L. Dardé. 2012. "Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis." *Clinical Microbiology Reviews* 25 (2): 264–96. <https://doi.org/10.1128/CMR.05013-11>.

- Rochet, E., N. Argy, V. Greigert, J. Brunet, M. Sabou, L. Marcellin, A. de-la-Torre, Arnaud Sauer, E. Candolfi, and A. W. Pfaff. 2019. "Type I ROP16 Regulates Retinal Inflammatory Responses during Ocular Toxoplasmosis." *PLOS ONE* 14 (3): e0214310. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214310>.
- Ronday, M. J. H., L. Luyendijk, G. S. Baarsma, J.-G. Bollemeijer, A. Van der Lelij, and A. Rothova. 1995. "Presumed Acquired Ocular Toxoplasmosis." *Archives of Ophthalmology* 113 (12): 1524–29. <https://doi.org/10.1001/archopht.1995.01100120054009>.
- Ross, R. D., L. A. Stec, J. C. Werner, M. S. Blumenkranz, L. Glazer, and G. A. Williams. 2001. "Presumed acquired ocular toxoplasmosis in deer hunters" *Retina* 21 (3): 226–29. <https://doi.org/10.1097/00006982-200106000-00005>.
- Saeij, J. P. J., J. P. Boyle, S. Collier, S. Taylor, L. D. Sibley, E. T. Brooke-Powell, J. W. Ajioka, and J. C. Boothroyd. 2006. "Polymorphic Secreted Kinases Are Key Virulence Factors in Toxoplasmosis." *Science (New York, N.Y.)* 314 (5806): 1780–83. <https://doi.org/10.1126/science.1133690>.
- Sangaré, L. O., N. Yang, E. K. Konstantinou, D. Lu, D. Mukhopadhyay, L. H. Young, and J. P. J. Saeij. 2019. "Toxoplasma GRA15 Activates the NF- κ B Pathway through Interactions with TNF Receptor-Associated Factors." *MBio* 10 (4). <https://doi.org/10.1128/mBio.00808-19>.
- Sauer, A., O. Villard, T. Bourcier, C. Speeg-Schatz, and E. Candolfi. 2013. "Toxoplasmose oculaire : de la physiopathologie au diagnostic microbiologique." *Journal Français d'Ophthalmologie* 36 (1): 76–81. <https://doi.org/10.1016/j.jfo.2012.05.004>.
- Schade, B., and H.-G. Fischer. 2001. "Toxoplasma gondii Induction of Interleukin-12 Is Associated with Acute Virulence in Mice and Depends on the Host Genotype." *Veterinary Parasitology, Vaccination and Immunity against Parasites*, 100 (1): 63–74. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00484-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00484-8).
- Sedlák, K., I. Literák, M. Faldyna, M. Toman, and J. Benák. 2000. "Fatal Toxoplasmosis in Brown Hares (*Lepus europaeus*): Possible Reasons of Their High Susceptibility to the Infection." *Veterinary Parasitology* 93 (1): 13–28. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(00\)00325-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00325-3).
- Shastri, A. J., N. D. Marino, M. Franco, M. B. Lodoen, and J. C. Boothroyd. 2014. "GRA25 Is a Novel Virulence Factor of *Toxoplasma gondii* and Influences the Host Immune Response." *Infection and Immunity* 82 (6): 2595–2605. <https://doi.org/10.1128/IAI.01339-13>.
- Shwab, E. Keats, X.-Q. Zhu, D. Majumdar, H. F. J. Pena, S. M. Gennari, J. P. Dubey, and C. Su. 2014. "Geographical Patterns of *Toxoplasma gondii* Genetic Diversity Revealed by Multilocus PCR-RFLP Genotyping." *Parasitology* 141 (4): 453–61. <https://doi.org/10.1017/S0031182013001844>.

- Shwab, E. Keats, P. Saraf, X.-Q. Zhu, D.-H. Zhou, B. M. McFerrin, D. Ajzenberg, G. Schares, K. Hammond-Aryee, P. van Helden, S. A. Higgins, R. W. Gerhold, B. M. Rosenthal, X. Zhao, J. P. Dubey, and C. Su. 2018. "Human Impact on the Diversity and Virulence of the Ubiquitous Zoonotic Parasite *Toxoplasma gondii*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (29): E6956–63. <https://doi.org/10.1073/pnas.1722202115>.
- Sibley, L. D., A. J. LeBlanc, E. R. Pfefferkorn, and J. C. Boothroyd. 1992. "Generation of a Restriction Fragment Length Polymorphism Linkage Map for *Toxoplasma gondii*." *Genetics* 132 (4): 1003–15.
- Sibley, L. David, and John C. Boothroyd. 1992. "Virulent Strains of *Toxoplasma gondii* Comprise a Single Clonal Lineage." *Nature* 359 (6390): 82–85. <https://doi.org/10.1038/359082a0>.
- Sikes, R. S., W. L. Gannon, and the Animal Care and Use Committee of the American Society of Mammalogists. 2011. "Guidelines of the American Society of Mammalogists for the Use of Wild Mammals in Research." *Journal of Mammalogy* 92 (1): 235–53. <https://doi.org/10.1644/10-MAMM-F-355.1>.
- Sobanski, V., D. Ajzenberg, L. Delhaes, N. Bautin, and N. Just. 2013. "Severe Toxoplasmosis in Immunocompetent Hosts: Be Aware of Atypical Strains." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 187 (10): 1143–45. <https://doi.org/10.1164/rccm.201209-1635LE>.
- Splendore, A. 1908. "Un nuovo protozoa parassita de' conigli. incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell' uomo". Nota preliminare pel. *Rev. Soc. Scient. Sao Paulo*, 3, pp. 109-112.
- Steinfeldt, T., S. Könen-Waisman, L. Tong, N. Pawlowski, T. Lamkemeyer, L. D. Sibley, J. P. Hunn, and J. C. Howard. 2010. "Phosphorylation of Mouse Immunity-Related GTPase (IRG) Resistance Proteins Is an Evasion Strategy for Virulent *Toxoplasma gondii*." *PLOS Biology* 8 (12): e1000576. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000576>.
- Su, C., D. Evans, R. H. Cole, J. C. Kissinger, J. W. Ajioka, and L. D. Sibley. 2003. "Recent Expansion of *Toxoplasma* Through Enhanced Oral Transmission." *Science* 299 (5605): 414–16. <https://doi.org/10.1126/science.1078035>.
- Su, C., E. K. Schwab, P. Zhou, X. Q. Zhu, and J. P. Dubey. 2010. "Moving towards an Integrated Approach to Molecular Detection and Identification of *Toxoplasma gondii*." *Parasitology* 137 (01): 1. <https://doi.org/10.1017/S0031182009991065>.
- Su, C., X. Zhang, and J. P. Dubey. 2006. "Genotyping of *Toxoplasma gondii* by Multilocus PCR-RFLP Markers: A High Resolution and Simple Method for Identification of Parasites." *International Journal for Parasitology* 36 (7): 841–48. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.03.003>.
- Su, C., A. Khan, P.g Zhou, D. Majumdar, D. Ajzenberg, M.-L. Dardé, X.-Q. Zhu, J. W. Ajioka, B. M. Rosenthal, and J. P. Dubey. 2012. "Globally Diverse *Toxoplasma gondii* Isolates Comprise Six Major Clades Originating from a Small Number of Distinct Ancestral Lineages." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (15): 5844–5849.

- Taila, A. K., A. S. Hingwe, and L. E. Johnson. 2011. "Toxoplasmosis in a Patient Who Was Immunocompetent: A Case Report." *Journal of Medical Case Reports* 5 (1): 16. <https://doi.org/10.1186/1752-1947-5-16>.
- Thomasson, D., E. A. Wright, J. M. Hughes, N. S. Dodd, A. P. Cox, K. Boyce, O. Gerwash, et al. 2011. "Prevalence and Co-Infection of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in *Apodemus sylvaticus* in an Area Relatively Free of Cats." *Parasitology* 138 (9): 1117–23.
- Thornton T. A., Bermejo J. L. "Local and global ancestry inference and applications to genetic association analysis for admixed populations." *Genetic Epidemiology*. 2014;38(S1):S5-S12
- Tourdjman, M., C. Tchéandjieu, H. De Valk, and V. Goulet. 2015. "Toxoplasmoses Chez Les Femmes Enceintes En France: Évolution de La Séroprévalence et Des Facteurs Associés Entre 1995 et 2010, à Partir Des Enquêtes Nationales Périnatales." *Bull Epidémiol Hebd*, 15–16.
- Van der Straeten E., and W.N. Verheyen. 1978. "Taxonomical notes on the West-African *Myomys* with the description of *Myomys derooi* (Mammalia-Muridae)" *Zeitschrift für Säugetierkunde*, <https://www.biodiversitylibrary.org/page/45539634#page/7/mode/1up>.
- Wendte, J. M., M. A. Miller, D. M. Lambourn, S. L. Magargal, D. A. Jessup, and M. E. Grigg. 2010. "Self-Mating in the Definitive Host Potentiates Clonal Outbreaks of the Apicomplexan Parasites *Sarcocystis neurona* and *Toxoplasma gondii*." *PLOS Genetics* 6 (12): e1001261. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001261>.
- Xia, J.g, A. Venkat, K. Le Roch, F. Ay, and J. P. Boyle. preprint, 2020. "Third Generation Sequencing Revises the Molecular Karyotype for *Toxoplasma Gondii* and Identifies Emerging Copy Number Variants in Sexual Recombinants." *BioRxiv*, March, 2020.03.10.985549. <https://doi.org/10.1101/2020.03.10.985549>.
- Yalcindag, E., E. Elguero, C. Arnathau, P. Durand, J. Akiana, T. J. Anderson, A. Aubouy, F. Balloux, P. Besnard, H. Bogreau, P. Carnevale, U. D'Alessandro, D. Fontenille, D. Gamboa, T. Jombart, J. Le Mire, E. Leroy, A. Maestre, M. Mayxay, D. Ménard, L. Musset, P. N. Newton, D. Nkoghé, O. Noya, B. Ollomo, C. Rogier, V. Veron, A. Wide, S. Zakeri, B. Carne, E. Legrand, C. Chevillon, F. J. Ayala, F. Renaud, and F. Prugnolle. 2012. "Multiple Independent Introductions of *Plasmodium falciparum* in South America." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (2): 511–16. <https://doi.org/10.1073/pnas.1119058109>.
- Yan, C., C. L. Yue, Z. G. Yuan, R. Q. Lin, Y. He, C. C. Yin, M. J. Xu, H. Q. Song, and X. Q. Zhu. 2010. "Molecular and Serological Diagnosis of *Toxoplasma gondii* Infection in Experimentally Infected Chickens." *Veterinary Parasitology* 173 (3): 179–83. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.07.011>.
- Zhao, Y., D. J. P. Ferguson, D. C. Wilson, J. C. Howard, L. D. Sibley, and G. S. Yap. 2009. "Virulent *Toxoplasma gondii* Evade Immunity-Related GTPase-Mediated Parasite Vacuole Disruption within Primed Macrophages." *The Journal of Immunology* 182 (6): 3775–81. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0804190>.

Sites internet

- https://fr.wikipedia.org/wiki/Géographie_du_Bénin (consulté le 24 août 2020)
- <https://www.diplomatie.gouv.fr/fr/conseils-aux-voyageurs/conseils-par-pays-destination/benin> (consulté le 2 septembre 2020)
- <https://capaustral.com/climat-meteo-benin.php> (consulté le 6 septembre 2020)
- <https://www.populationdata.net/palmares/population> (consulté le 6 septembre 2020)
- <https://www.axl.cefan.ulaval.ca/afrique/benin.htm> (consulté le 6 septembre 2020)
- <http://portcotonou.com/index.php/statistiques> (consulté le 6 septembre 2020)

Annexes

Annexe 1. Echantillonnage sur animaux domestiques réalisé dans le cadre de l'étude de terrain au Bénin	127
Annexe 2. Analyses complémentaires en génétique des populations sur le Type III	153
Annexe 3. Analyses complémentaires en génétique des populations sur l'Africa 4	154
Annexe 4. Echantillonnage sur rongeurs et autres micromammifères réalisé dans le cadre de l'étude de terrain au Bénin.....	155
Annexe 5. Script Poppr.....	165
Annexe 6. Script simPLOT	166
Annexe 7. Script bash pour isoler les gènes variants.....	168
Annexe 8. Poster présenté au International <i>Toxoplasma</i> Congress XV (Toxo XV), Quindio, Colombie (juin 2019)	169

P28	29/05/2018	G. dom	O	Abomey-Calavi	Djigbé	6.5336503 1350404	2.322599636 3908052	F	1 an	NEG
P29	29/05/2018	G. dom	O	Abomey-Calavi	Djigbé	6.5341527 72543787	2.321852557 361126	F	1 an	NEG
P30	29/05/2018	G. dom	O	Abomey-Calavi	Djigbé	6.5341527 72543787	2.321852557 361126	M	1 an	NEG
P31	29/05/2018	G. dom	O	Abomey-Calavi	Djigbé	6.5341527 72543787	2.321852557 361126	F	1 an	NEG
P32	29/05/2018	G. dom	O	Abomey-Calavi	Djigbé	6.5341527 72543787	2.321852557 361126	F	1 an	NEG
P33	29/05/2018	G. dom	O	Abomey-Calavi	Djigbé	6.5341527 72543787	2.321852557 361126	F	1 an	NEG
P34	29/05/2018	G. dom	O	Abomey-Calavi	Djigbé	6.5341527 72543787	2.321852557 361126	F	1 an	NEG
P35	29/05/2018	G. dom	O	Abomey-Calavi	Djigbé	6.5341527 72543787	2.321852557 361126	F	1 an	NEG
P36	29/05/2018	G. dom	O	Abomey-Calavi	Djigbé	6.5336503 1350404	2.322599636 3908052	F	1 an	NEG
P37	29/05/2018	G. dom	O	Abomey-Calavi	Djigbé	6.5336503 1350404	2.322599636 3908052	F	1 an	NEG
P38	31/05/2018	G. dom	O	Abomey-Calavi	Seme Aïfa	6.4650892 37317443	2.332361368 4624434	F	1 an	NEG
P39	31/05/2018	G. dom	O	Abomey-Calavi	Seme Aïfa	6.4650892 37317443	2.332361368 4624434	F	1 an	NEG
P40	31/05/2018	G. dom	O	Abomey-Calavi	Seme Aïfa	6.4650892 37317443	2.332361368 4624434	M	1 an	NEG
P41	31/05/2018	G. dom	O	Abomey-Calavi	Seme Aïfa	6.4650892 37317443	2.332361368 4624434	M	1 an	NEG
P42	31/05/2018	G. dom	O	Abomey-Calavi	Seme Aïfa	6.4650892 37317443	2.332361368 4624434	F	1 an	NEG
P43	31/05/2018	G. dom	O	Abomey-Calavi	Seme Aïfa	6.4650892 37317443	2.332361368 4624434	M	1 an	NEG
P44	31/05/2018	G. dom	O	Abomey-Calavi	Seme Aïfa	6.4650892 37317443	2.332361368 4624434	M	1 an	NEG
P45	31/05/2018	G. dom	O	Abomey-Calavi	Seme Aïfa	6.4650892 37317443	2.332361368 4624434	M	1 an	NEG
P46	31/05/2018	G. dom	O	Abomey-Calavi	Seme Aïfa	6.4650892 37317443	2.332361368 4624434	F	1 an	NEG
P47	31/05/2018	G. dom	O	Abomey-Calavi	Seme Aïfa	6.4650892 37317443	2.332361368 4624434	F	1 an	NEG
P48	31/05/2018	G. dom	O	Abomey-Calavi	Seme Aïfa	6.4650892 37317443	2.332361368 4624434	F	1 an	NEG
P49	31/05/2018	G. dom	O	Abomey-Calavi	Seme Aïfa	6.4650892 37317443	2.332361368 4624434	F	1 an	NEG
P50	31/05/2018	<i>Meleagris gallopavo</i>	O	Abomey-Calavi	Seme Aïfa	6.4650892 37317443	2.332361368 4624434	M	1 an	NEG
P51	31/05/2018	G. dom	O	Abomey-Calavi	Seme Aïfa	6.4648819	2.3314658	F	1 an	NEG
P52	31/05/2018	G. dom	O	Abomey-Calavi	Seme Aïfa	6.4648819	2.3314658	M	1 an	NEG
P53	31/05/2018	G. dom	O	Abomey-Calavi	Seme Aïfa	6.4648819	2.3314658	M	1 an	NEG
P54	31/05/2018	G. dom	O	Abomey-Calavi	Seme Aïfa	6.4648819	2.3314658	M	1 an	NEG
P55	31/05/2018	G. dom	O	Abomey-Calavi	Seme Aïfa	6.4648819	2.3314658	F	1 an	NEG
P56	31/05/2018	G. dom	O	Abomey-Calavi	Seme Aïfa	6.4648819	2.3314658	M	1 an	NEG
P57	31/05/2018	G. dom	O	Abomey-Calavi	Seme Aïfa	6.4648819	2.3314658	M	1 an	NEG

P58	31/05/2018	G. dom	O	Abomey-Calavi	Seme Aifa	6.4648819	2.3314658	F	1 an	NEG								
P59	31/05/2018	G. dom	O	Abomey-Calavi	Seme Aifa	6.4648819	2.3314658	F	1 an	NEG								
P60	31/05/2018	G. dom	O	Abomey-Calavi	Seme Aifa	6.4648819	2.3314658	F	1 an	NEG								
P61	01/06/2018	G. dom	O	Cotonou	Sainte-Rita	6.386263	2.398784	F	1 an	POS	O	07/06/2018	O	07/06/2018	O	08/06/2018	O	14/06/2018 Ascite J6 x1S
P62	01/06/2018	G. dom	O	Cotonou	Sainte-Rita	6.386263	2.398784	F	1 an	POS	N		N					
P63	01/06/2018	G. dom	O	Cotonou	Sainte-Rita	6.386263	2.398784	F	1 an	POS	O	07/06/2018	O	07/06/2018	O	08/06/2018	O	14/06/2018 Ascite J6 x3S
P64	01/06/2018	G. dom	O	Cotonou	Sainte-Rita	6.386263	2.398784	F	1 an	POS	N		N					
P65	01/06/2018	G. dom	O	Cotonou	Sainte-Rita	6.386263	2.398784	F	1 an	EQV								
P66	01/06/2018	G. dom	O	Cotonou	Sainte-Rita	6.386263	2.398784	F	1 an	POS	N		N					
P67	01/06/2018	G. dom	O	Cotonou	Sainte-Rita	6.3864542	2.3986154	M	1 an	NEG								
P68	01/06/2018	G. dom	O	Cotonou	Sainte-Rita	6.3864542	2.3986154	M	1 an	NEG								
P69	01/06/2018	G. dom	O	Cotonou	Sainte-Rita	6.3864542	2.3986154	F	1 an	NEG								
P70	01/06/2018	G. dom	O	Cotonou	Sainte-Rita	6.3864542	2.3986154	M	1 an	POS	N		N					
P71	01/06/2018	G. dom	O	Cotonou	Sainte-Rita	6.3864542	2.3986154	F	1 an	NEG								
P72	01/06/2018	G. dom	O	Cotonou	Sainte-Rita	6.3867693	2.3982056	M	1 an	NEG								
P73	01/06/2018	G. dom	O	Cotonou	Sainte-Rita	6.3867693	2.3982056	F	1 an	NEG								
P74	01/06/2018	G. dom	O	Cotonou	Sainte-Rita	6.3867693	2.3982056	M	1 an	NEG								
P75	01/06/2018	G. dom	O	Cotonou	Sainte-Rita	6.3867693	2.3982056	F	1 an	NEG								
P76	01/06/2018	G. dom	O	Cotonou	Sainte-Rita	6.3867693	2.3982056	F	1 an	NEG								
P77	01/06/2018	G. dom	O	Cotonou	Sainte-Rita	6.3865317	2.3952975	M	1 an	NEG								
P78	01/06/2018	G. dom	O	Cotonou	Sainte-Rita	6.3865317	2.3952975	F	1 an	POS	N		N					
P79	01/06/2018	G. dom	O	Cotonou	Sainte-Rita	6.3865317	2.3952975	F	1 an	EQV								
P80	01/06/2018	G. dom	O	Cotonou	Sainte-Rita	6.3865317	2.3952975	F	1 an	EQV								
P81	01/06/2018	G. dom	O	Cotonou	Sainte-Rita	6.3865317	2.3952975	F	1 an	POS	N		N					
P82	01/06/2018	G. dom	O	Cotonou	Sainte-Rita	6.3865317	2.3952975	F	1 an	POS	O	07/06/2018	O	07/06/2018	O	08/06/2018	O	14/06/2018 Ascite J6 x3S
P83	01/06/2018	G. dom	O	Cotonou	Fifadji	6.3980195	2.3965687	M	1 an	POS	N		N					
P84	01/06/2018	G. dom	O	Cotonou	Fifadji	6.3980195	2.3965687	M	1 an	POS	O	07/06/2018	O	07/06/2018	O	08/06/2018	O	21/06/2018 Ascite J12x3S
P85	01/06/2018	G. dom	O	Cotonou	Fifadji	6.3980195	2.3965687	F	1 an	POS	N		N					
P86	01/06/2018	G. dom	O	Cotonou	Fifadji	6.3980195	2.3965687	M	1 an	NEG								
P87	01/06/2018	G. dom	O	Cotonou	Fifadji	6.3980195	2.3965687	M	1 an	NEG								

P88	01/06/2018	G. dom	O	Cotonou	Fifadji	6.3943695	2.3987341	F	1 an	NEG									
P89	05/06/2018	G. dom	O	Cotonou	Fidjrossé	6.3599107	2.3753852	M	1 an	NEG									
P90	05/06/2018	G. dom	O	Cotonou	Fidjrossé	6.3599107	2.3753852	M	1 an	NEG									
P91	05/06/2018	G. dom	O	Cotonou	Fidjrossé	6.3599107	2.3753852	M	1 an	NEG									
P92	05/06/2018	G. dom	O	Cotonou	Fidjrossé	6.3601641	2.3762655	F	1 an	POS	O	07/06/2018	O	07/06/2018	O	08/06/2018	N		
P93	05/06/2018	G. dom	O	Cotonou	Fidjrossé	6.3601841	2.3771418	M	1 an	POS	N		N						
P94	05/06/2018	G. dom	O	Cotonou	Fidjrossé	6.3601841	2.3771418	M	1 an	POS	O	07/06/2018	O	07/06/2018	O	08/06/2018	O	14/06/2018	Ascite J6 x3S
P95	05/06/2018	G. dom	O	Cotonou	Fidjrossé	6.3601841	2.3771418	M	1 an	POS	O	07/06/2018	O	07/06/2018	O	08/06/2018	O	18/06/2018	Ascite J10 x1S
P96	05/06/2018	G. dom	O	Cotonou	Fidjrossé	6.3601841	2.3771418	F	1 an	POS	N		N						
P97	05/06/2018	G. dom	O	Cotonou	Fidjrossé	6.3601841	2.3771418	F	1 an	POS	N		N						
P98	05/06/2018	G. dom	O	Cotonou	Fidjrossé	6.3601841	2.3771418	F	1 an	POS	N		N						
P99	05/06/2018	G. dom	O	Cotonou	Fidjrossé	6.3600598	2.3779944	F	1 an	EQV									
P100	05/06/2018	G. dom	O	Cotonou	Fidjrossé	6.3600598	2.3779944	M	1 an	NEG									
P101	28/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Plage	6.3265152 55495906	2.084105992 6897287	M	1 an 1/2	NEG									
P102	28/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Plage	6.3265152 55495906	2.084105992 6897287	F	5 mois	NEG									
P103	28/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Plage	6.3265152 55495906	2.084105992 6897287	F	5 mois	NEG									
P104	28/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Plage	6.3265152 55495906	2.084105992 6897287	F	14 mois	NEG									
P105	28/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Plage	6.3273434	2.0825568	F	1 an	NEG									
P106	28/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Plage	6.3394638	2.0914579	M	6 mois	NEG									
P107	28/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Plage	6.3394638	2.0914579	F	1 an	NEG									
P108	28/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Plage	6.3394638	2.0914579	F	1 an	NEG									
P109	28/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Plage	6.3394638	2.0914579	F	2 ans	NEG									
P110	28/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Plage	6.3394638	2.0914579	F	6 mois	NEG									
P111	28/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Plage	6.3394638	2.0914579	F	1 an	NEG									
P112	28/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Plage	6.3394124 89905953	2.091555241 495371	F	1 an	POS	O	10/07/2018	O	10/07/2018	O	11/07/2018	O	04/08/2018	Kystes x1S
P113	28/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Plage	6.3394124 89905953	2.091555241 495371	M	4 ans	NEG									
P114	28/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Plage	6.3394124 89905953	2.091555241 495371	M	1 an	NEG									
P115	28/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Plage	6.3394124 89905953	2.091555241 495371	F	2 ans	NEG									
P116	28/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Plage	6.3394124 89905953	2.091555241 495371	F	2 ans	NEG									
P117	28/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Plage	6.3401955	2.0875086	F	3 mois	NEG									
P118	28/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Plage	6.3401955	2.0875086	F	2 ans	NEG									

P119	28/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Plage	6.3401955	2.0875086	M	1 an	NEG										
P120	28/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Plage	6.3401955	2.0875086	F	1 an	NEG										
P121	28/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Plage	6.3401955	2.0875086	F	1 an	NEG										
P122	28/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Plage	6.3401955	2.0875086	F	1an	NEG										
P123	28/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Plage	6.3396178	2.088892	M	6 mois	NEG										
P124	28/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Plage	6.3396178	2.088892	F	10 mois	NEG										
P125	28/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Plage	6.3396178	2.088892	F	4 mois	NEG										
P126	28/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Plage	6.3396178	2.088892	F	8 mois	NEG										
P127	28/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Plage	6.3253338 68153393	2.085184324 5327473	F	1 an	NEG										
P128	28/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Plage	6.3253338 68153393	2.085184324 5327473	F	9 mois	NEG										
P129	29/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Plage	6.3416756 87581301	2.082722224 2951393	F	7 mois	NEG										
P130	29/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Plage	6.3416756 87581301	2.082722224 2951393	F	7 mois	NEG										
P131	29/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Plage	6.3416756 87581301	2.082722224 2951393	M	7 mois	NEG										
P132	29/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Plage	6.3265661 75557673	2.084514107 55515	F	9 mois	NEG										
P133	29/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Plage	6.3265661 75557673	2.084514107 55515	M	9 mois	NEG										
P134	29/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Plage	6.3278349 86150265	2.082905704 1555643	M	7 mois	NEG										
P135	29/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Plage	6.3278349 86150265	2.082905704 1555643	M	1 an	NEG										
P136	29/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Plage	6.3278349 86150265	2.082905704 1555643	F	7 mois	NEG										
P137	29/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Plage	6.3273434	2.0825568	M	4 mois	NEG										
P138	29/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Plage	6.3273434	2.0825568	F	4 mois	NEG										
P139	29/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Plage	6.3235082	2.0870445	F	7 mois	NEG										
P140	29/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Plage	6.3235082	2.0870445	F	7 mois	NEG										
P141	29/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Nord	6.3732001 09228492	2.073544040 3223038	F	1 an	POS	O	10/07/2018	O	10/07/2018	O	11/07/2018	O	21/07/2018	Ascite J10 x2S	
P142	29/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Nord	6.3732001 09228492	2.073544040 3223038	F	1 an	NEG										
P143	29/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Nord	6.3732001 09228492	2.073544040 3223038	M	2 ans	NEG										
P144	29/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Nord	6.3733477 14543343	2.072755219 41483	M	1 an	NEG										
P145	29/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Nord	6.3733477 14543343	2.072755219 41483	F	1 an	NEG										
P146	29/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Nord	6.3733477 14543343	2.072755219 41483	M	1an	NEG										
P147	29/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Centre	6.3598241	2.0846844	F	1 an	POS	O	10/07/2018	O	10/07/2018	O	11/07/2018	O	25/07/2018	Ascite J14 x1S	
P148	29/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Centre	6.3598241	2.0846844	M	1 an	POS	O	10/07/2018	O	10/07/2018	O	11/07/2018	N			
P149	29/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Centre	6.3598241	2.0846844	M	2 ans	POS	N									

P150	29/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Centre	6.3598241	2.0846844	F	1 an	NEG									
P151	29/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Centre (Prison Civile)	6.3555323	2.0749062	M	6 mois	NEG									
P152	29/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Centre (Prison Civile)	6.3555323	2.0749062	M	6 mois	NEG									
P153	29/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Centre (Prison Civile)	6.3555323	2.0749062	F	7 mois	NEG									
P154	29/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Centre (Prison Civile)	6.3555323	2.0749062	M	1 an	NEG									
P155	29/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Centre (Prison Civile)	6.3555323	2.0749062	F	1an	NEG									
P156	29/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Centre	6.3627631 310373545	2.080707969 1439867	M	5m	NEG									
P157	29/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Centre	6.3627631 310373545	2.080707969 1439867	F	5m	NEG									
P158	29/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Centre	6.3627631 310373545	2.080707969 1439867	M	4m	NEG									
P159	30/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Bossouvi	6.4484626	2.0678759	F	2y	POS	N								
P160	30/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Bossouvi	6.4484626	2.0678759	F	2y	EQV	O	10/07/2018	O	10/07/2018	O	11/07/2018	N		
P161	30/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Bossouvi	6.4484626	2.0678759	F	2y	POS	N								
P162	30/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Bossouvi	6.4484626	2.0678759	F	2y	POS	O	10/07/2018	O	10/07/2018	O	11/07/2018	O	24/07/2018	Ascite J13x1S
P163	30/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Bossouvi	6.4483591	2.067742	F	2y	POS	N								
P164	30/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Bossouvi	6.4509003 93538177	2.066060593 3517218	F	8m	NEG									
P165	30/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Bossouvi	6.4509003 93538177	2.066060593 3517218	F	4m	NEG									
P166	30/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Bossouvi	6.4509003 93538177	2.066060593 3517218	F	4m	NEG									
P167	30/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Bossouvi	6.4509003 93538177	2.066060593 3517218	F	10m	NEG									
P168	30/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Bossouvi	6.4509003 93538177	2.066060593 3517218	M	4m	NEG									
P169	30/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Bossouvi	6.4509003 93538177	2.066060593 3517218	F	4m	NEG									
P170	30/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Bossouvi	6.4509003 93538177	2.066060593 3517218	F	4m	POS	O	10/07/2018	O	10/07/2018	O	11/07/2018	O	21/08/2018	Ascite J10x3S
P171	30/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Bossouvi	6.4509003 93538177	2.066060593 3517218	F	2y	NEG									
P172	30/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Bossouvi	6.4509003 93538177	2.066060593 3517218	F	1y1/2	NEG									
P173	30/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Bossouvi	6.4509003 93538177	2.066060593 3517218	F	1y	NEG									
P174	30/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Bossouvi	6.4484858	2.0685657	F	4m	NEG									
P175	30/06/2018	Numida meleag ris	O	Ouidah	Bossouvi	6.4484858	2.0685657		9m	NEG									
P176	30/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Bossouvi	6.4484858	2.0685657	M	5m	NEG									
P177	30/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Tchiakpe	6.3923456	2.1748909	F	1y	POS	O	10/07/2018	O	10/07/2018	O	11/07/2018	O	24/07/2018	Ascite J14x3S
P178	30/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Tchiakpe	6.3932699 89639521	2.174984347 075224	F	1y	NEG									
P179	30/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Tchiakpe	6.3932699 89639521	2.174984347 075224	F	1y	POS	O	10/07/2018	O	10/07/2018	O	11/07/2018	N		
P180	30/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Tchiakpe	6.3932699 89639521	2.174984347 075224	M	9m	NEG									

P181	30/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Tchiakpe	6.3938457 844778895	2.175806527 95732	F	6m	NEG									
P182	30/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Tchiakpe	6.3948569	2.1756357	F	1y	POS	O	10/07/2018	O	10/07/2018	O	11/07/2018	N		
P183	30/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Tchiakpe	6.3948569	2.1756357	M	5m	NEG									
P184	30/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Tchiakpe	6.3931683 59063566	2.176239453 25613	F	1y	NEG									
P185	30/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Tchiakpe	6.3931683 59063566	2.176239453 25613	F	1y	NEG									
P186	30/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3915677 50833929	1.937726447 3587275	F	6m	NEG									
P187	30/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3915677 50833929	1.937726447 3587275	M	6m	NEG									
P188	30/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3915677 50833929	1.937726447 3587275	M	6m	NEG									
P189	30/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3915677 50833929	1.937726447 3587275	F	6m	NEG									
P190	30/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3915677 50833929	1.937726447 3587275	M	6m	NEG									
P191	30/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3911268 62727106	1.937881931 6625595	F	1y	EQV	O	10/07/2018	O	10/07/2018	O	11/07/2018	O	16/08/2018	Kystes x1S (séro+ x2S)
P192	30/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3911268 62727106	1.937881931 6625595	M	1y	NEG									
P193	30/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3911268 62727106	1.937881931 6625595	F	2y	EQV	O	10/07/2018	O	10/07/2018	O	11/07/2018	O	16/08/2018	Kystes x2S (séro+ x2S)
P194	30/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3911268 62727106	1.937881931 6625595	F	4m	NEG									
P195	30/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3911268 62727106	1.937881931 6625595	F	2m	NEG									
P196	30/06/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3911268 62727106	1.937881931 6625595	F	1y	POS	N								
P197	01/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Tchiakpe	6.3925817 0966059	2.175241000 9503365	F	9m	POS	N								
P198	01/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Tchiakpe	6.3925817 0966059	2.175241000 9503365	F	9m	POS	O	10/07/2018	O	10/07/2018	O	11/07/2018	N		
P199	01/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Tchiakpe	6.3928786	2.1753021	F	3y	POS	O	10/07/2018	O	10/07/2018	O	11/07/2018	O	16/08/2018	Séro+ x1S
P200	01/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Tchiakpe	6.3938029 94862199	2.176662070 043564	F	1y	EQV	N								
P201	01/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Tchiakpe	6.3926122 6169765	2.177167916 6704416	F	9m	NEG									
P202	01/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Tchiakpe	6.3926122 6169765	2.177167916 6704416	F	9m	NEG									
P203	01/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Tchiakpe	6.3926122 6169765	2.177167916 6704416	F	9m	NEG									
P204	01/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Tchiakpe	6.3926122 6169765	2.177167916 6704416	F	9m	NEG									
P205	01/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Tchiakpe	6.3925002	2.1771193	M	1y	POS	O	10/07/2018	O	10/07/2018	O	11/07/2018	O	20/07/2018	Ascite J9x2S
P206	01/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Tchiakpe	6.3925002	2.1771193	F	8m	NEG									
P207	01/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Tchiakpe	6.3925002	2.1771193	M	8m	NEG									
P208	01/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Tchiakpe	6.3925002	2.1771193	M	1y	POS	O	10/07/2018	O	10/07/2018	O	11/07/2018	N		
P209	01/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Tchiakpe	6.3929802 69156396	2.175921611 4878654	F	8m	NEG									

P210	01/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Tchiakpe	6.3911733 40380192	2.175416434 1837168	M	6m	NEG									
P211	01/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Tchiakpe	6.3911733 40380192	2.175416434 1837168	F	1y	NEG									
P212	03/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Centre	6.3618241 06425047	2.076464211 5682364	F	4m	NEG									
P213	03/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Centre	6.3618241 06425047	2.076464211 5682364	F	7m	POS	O	11/07/2018	O	11/07/2018	O	12/07/2018	O	16/08/2018	Séro+ x1S
P214	03/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Centre	6.3618241 06425047	2.076464211 5682364	F	1y	POS	N								
P215	03/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Centre	6.3621349 493041635	2.076272852 71883	F	1y	POS	O	11/07/2018	O	11/07/2018	O	12/07/2018	O	16/08/2018	Kystes x1S (séro+ x3S)
P216	03/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Centre	6.3621349 493041635	2.076272852 71883	M	6m	NEG									
P217	03/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Nord (Morgue)	6.3771651 685237885	2.097697416 320443	M	4m	NEG									
P218	03/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Nord (Morgue)	6.3771651 685237885	2.097697416 320443	M	4m	NEG									
P219	03/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Nord (Morgue)	6.3771651 685237885	2.097697416 320443	F	3y	POS	O	11/07/2018	O	11/07/2018	O	12/07/2018	O	23/07/2018	Ascite J11x2S
P220	03/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Nord (Morgue)	6.3771651 685237885	2.097697416 320443	F	2y	EQV	N								
P221	03/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Nord (Morgue)	6.3771651 685237885	2.097697416 320443	M	4m	NEG									
P222	03/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Nord (Morgue)	6.3771651 685237885	2.097697416 320443	M	6m	NEG									
P223	03/07/2018	A. platy	O	Ouidah	Ouidah Centre	6.3588256	2.0839302	F	1y1/2	NEG									
P224	03/07/2018	A. platy	O	Ouidah	Ouidah Centre	6.3588256	2.0839302	M	1y	NEG									
P225	03/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Centre	6.3588256	2.0839302	M	3m	NEG									
P226	03/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Centre	6.3588256	2.0839302	M	3m	NEG									
P227	03/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Centre	6.3591225 35213828	2.083803238 3471727	F	9m	NEG									
P228	03/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Centre	6.3588583 37625861	2.083696285 262704	M	9m	POS	O	11/07/2018	O	11/07/2018	O	12/07/2018	O	22/07/2018	Ascite J10x3S
P229	03/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Centre	6.3588583 37625861	2.083696285 262704	F	9m	NEG									
P230	03/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Centre	6.3588950 08452237	2.085774913 430214	F	6m	NEG									
P231	03/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Centre	6.3588950 08452237	2.085774913 430214	F	7m	POS									
P232	03/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Centre	6.3588950 08452237	2.085774913 430214	M	1y1/2	POS	O	11/07/2018	O	11/07/2018	O	12/07/2018	O	16/08/2018	Séro+ x1S
P233	03/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Centre	6.3588950 08452237	2.085774913 430214	M	1y1/2	NEG									
P234	03/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Centre	6.3571213 55831623	2.085976749 6585846	F	9m	NEG									
P235	03/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Centre	6.3571213 55831623	2.085976749 6585846	M	6m	NEG									
P236	03/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Centre	6.3571213 55831623	2.085976749 6585846	F	1y1/2	NEG									
P237	03/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Centre	6.3571213 55831623	2.085976749 6585846	M	9m	NEG									
P238	03/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Centre	6.3610334 41498876	2.091284254 565835	M	8m	NEG									
P239	03/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Centre	6.3610334 41498876	2.091284254 565835	M	8m	POS	O	11/07/2018	O	11/07/2018	O	12/07/2018	O	20/07/2018	Ascite J8x3S

P240	03/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Centre	6.3610334 41498876	2.091284254 565835	M	8m	NEG									
P241	03/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Centre	6.3608037	2.0910081	M	1y	NEG									
P242	03/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Centre	6.3608037	2.0910081	F	4m	NEG									
P243	03/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Centre	6.3605342 57255495	2.090984685 346484	M	6m	NEG									
P244	03/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Centre	6.3605342 57255495	2.090984685 346484	F	6m	NEG									
P245	03/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Centre	6.361848	2.0933287	F	2y	NEG									
P246	03/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Centre	6.361848	2.0933287	F	3m	NEG									
P247	03/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Centre	6.361848	2.0933287	M	2y	NEG									
P248	03/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Centre	6.361848	2.0933287	M	3m	NEG									
P249	04/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3955730 43264449	1.934966621 9204664	F	8m	POS	O	11/07/2018	O	11/07/2018	O	12/07/2018	O	04/08/2018	RICHAR D (Kystes x1S)
P250	04/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3955730 43264449	1.934966621 9204664	F	2y	POS	N								
P251	04/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3955730 43264449	1.934966621 9204664	M	1y	POS	N								
P252	04/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3961731 03712499	1.934907948 5982656	F	6m	NEG									
P253	04/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3961731 03712499	1.934907948 5982656	M	6m	NEG									
P254	04/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3961731 03712499	1.934907948 5982656	M	6m	NEG									
P255	04/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3961731 03712499	1.934907948 5982656	M	6m	NEG									
P256	04/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3961731 03712499	1.934907948 5982656	F	1y	NEG									
P257	04/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3961731 03712499	1.934907948 5982656	M	1y1/2	NEG									
P258	04/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3961731 03712499	1.934907948 5982656	F	1y1/2	POS	N								
P259	04/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3961731 03712499	1.934907948 5982656	F	1y	POS	O	11/07/2018	O	11/07/2018	O	12/07/2018	N		
P260	04/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3967581 60553873	1.935543045 4015732	M	1y	NEG									
P261	04/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3968925 64371228	1.935219252 4820566	F	1y	NEG									
P262	04/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3968925 64371228	1.935219252 4820566	F	1y	NEG									
P263	04/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3968925 64371228	1.935219252 4820566	F	1y1/2	NEG									
P264	04/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3965625	1.9352009	F	1y	NEG									
P265	04/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3965625	1.9352009	M	1y	NEG									
P266	04/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3965625	1.9352009	F	1y	NEG									
P267	04/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3965563 24325502	1.935283793 1364775	F	6m	NEG									
P268	04/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3965563 24325502	1.935283793 1364775	M	6m	NEG									
P269	04/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3958981 35378957	1.935025462 8807306	F	1y	NEG									
P270	04/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3958981 35378957	1.935025462 8807306	M	6m	NEG									

P271	04/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3958981 35378957	1.935025462 8807306	M	1y1/2	NEG							
P272	04/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3956171	1.9347081	F	6m	NEG							
P273	04/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3956171	1.9347081	F	6m	NEG							
P274	04/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3956171	1.9347081	F	6m	NEG							
P275	04/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3953065	1.9346072	M	6m	POS	O	11/07/2018	O	11/07/2018	O	12/07/2018	N
P276	04/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3953065	1.9346072	F	6m	NEG							
P277	04/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3953065	1.9346072	M	6m	NEG							
P278	04/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3953065	1.9346072	M	2y	POS	N						
P279	04/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3968833 442777395	1.934605864 8079634	F	2y	NEG							
P280	04/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3968833 442777395	1.934605864 8079634	F	2y	NEG							
P281	04/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3963892 31085777	1.935076341 0329819	F	4m	NEG							
P282	04/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3963892 31085777	1.935076341 0329819	F	2y	POS	O	11/07/2018	O	11/07/2018	O	12/07/2018	N
P283	04/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3963892 31085777	1.935076341 0329819	F	4m	NEG							
P284	04/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3963892 31085777	1.935076341 0329819	F	6m	NEG							
P285	04/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3963892 31085777	1.935076341 0329819	F	6m	NEG							
P286	04/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3963892 31085777	1.935076341 0329819	F	1y	NEG							
P287	04/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3964065 397158265	1.934957318 007946	M	1y	POS	O	11/07/2018	O	11/07/2018	O	12/07/2018	N
P288	04/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3964065 397158265	1.934957318 007946	M	1y	NEG							
P289	04/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3964065 397158265	1.934957318 007946	F	2m	NEG							
P290	04/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3964065 397158265	1.934957318 007946	F	1y	NEG							
P291	04/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3964065 397158265	1.934957318 007946	F	1y	NEG							
P292	04/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3964065 397158265	1.934957318 007946	F	1y	NEG							
P293	04/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3964065 397158265	1.934957318 007946	F	5m	NEG							
P294	04/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3964065 397158265	1.934957318 007946	F	8m	NEG							
P295	04/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3964065 397158265	1.934957318 007946	M	5m	NEG							
P296	04/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3964065 397158265	1.934957318 007946	M	6m	NEG							
P297	04/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Lac Ahémé	6.3964065 397158265	1.934957318 007946	F	7m	NEG							
P298	05/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Centre	6.3547273 16647768	2.065950036 048889	M	2y	NEG							
P299	05/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Centre	6.3547273 16647768	2.065950036 048889	F	1y1/2	NEG							
P300	05/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Centre	6.3547273 16647768	2.065950036 048889	M	1y	NEG							
P301	05/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Centre	6.3553448 53363931	2.065176218 7480927	F	2y	NEG							

P302	05/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Centre	6.3558830 97276092	2.064896682 277322	M	6m	NEG									
P303	05/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Centre	6.3577608 950436115	2.064275247 976184	F	3y	NEG									
P304	05/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Centre	6.3577608 950436115	2.064275247 976184	M	4y	NEG									
P305	05/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Centre	6.3577608 950436115	2.064275247 976184	F	2y	NEG									
P306	05/07/2018	G. dom	O	Ouidah	Ouidah Centre	6.3577186 92161143	2.065091896 802187	F	2y	NEG									
P307	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sebou Gombouérou	9.3161055 49223721	2.494350615 888834	F	6m	NEG									
P308	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sebou Gombouérou	9.3161055 49223721	2.494350615 888834	F	1y	NEG									
P309	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sebou Gombouérou	9.3158505 71729243	2.494396381 0801506	F	1y	NEG									
P310	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sebou Gombouérou	9.3155998 27095866	2.494134865 7011986	F	1y	NEG									
P311	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sebou Gombouérou	9.3155998 27095866	2.494134865 7011986	F	1y	NEG									
P312	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sebou Gombouérou	9.3158610 49108207	2.493091151 1182785	F	3y	NEG									
P313	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sebou Gombouérou	9.3158610 49108207	2.493091151 1182785	F	2y	NEG									
P314	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sebou Gombouérou	9.3162656	2.4931909	F	6m	NEG									
P315	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sebou Gombouérou	9.3162656	2.4931909	F	6m	NEG									
P316	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sebou Gombouérou	9.3161025 73648095	2.492558481 171727	F	2y	NEG									
P317	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sebou Gombouérou	9.3161025 73648095	2.492558481 171727	F	6m	NEG									
P318	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sebou Gombouérou	9.3161025 73648095	2.492558481 171727	F	6m	NEG									
P319	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sebou Gombouérou	9.3161025 73648095	2.492558481 171727	F	6m	NEG									
P320	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sebou Gombouérou	9.3176105	2.4921437	F	6m	NEG									
P321	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sebou Gombouérou	9.3176105	2.4921437	F	1y	NEG									
P322	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sebou Gombouérou	9.3175658 0248475	2.492558145 8956003	M	6m	NEG									
P323	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sebou Gombouérou	9.3175658 0248475	2.492558145 8956003	M	6m	NEG									
P324	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sebou Gombouérou	9.3175658 0248475	2.492558145 8956003	M	6m	NEG									
P325	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sebou Gombouérou	9.3175658 0248475	2.492558145 8956003	M	6m	NEG									
P326	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sebou Gombouérou	9.3175658 0248475	2.492558145 8956003	F	6m	NEG									
P327	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sebou Gombouérou	9.3175658 0248475	2.492558145 8956003	F	6m	NEG									
P328	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sebou Gombouérou	9.3172189	2.4926287	F	1y	POS	O	14/08/2018	O	14/08/2018	O	15/08/2018	O	02/09/2018	Ascite J18
P329	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sebou Gombouérou	9.3172189	2.4926287	F	1y	NEG									
P330	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sebou Gombouérou	9.3172189	2.4926287	F	1y	NEG									
P331	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sebou Gombouérou	9.3172189	2.4926287	M	6m	NEG									
P332	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sebou Centre	9.3128757 50474632	2.490865252 9120445	F	4y	POS	O	14/08/2018	O	14/08/2018	O	15/08/2018	O	28/08/2018	Ascite J13x3S

P333	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sebou Centre	9.3128757 50474632	2.490865252 9120445	M	1y	NEG									
P334	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sebou Centre	9.3128757 50474632	2.490865252 9120445	F	1y	NEG									
P335	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sebou Centre	9.3128757 50474632	2.490865252 9120445	F	1y	NEG									
P336	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sebou Centre	9.3128757 50474632	2.490865252 9120445	F	1y	NEG									
P337	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sebou Centre	9.3128757 50474632	2.490865252 9120445	M	2y	NEG									
P338	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sebou Centre	9.3129148 93962443	2.491537649 1844654	F	6m	NEG									
P339	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sebou Centre	9.3129148 93962443	2.491537649 1844654	M	6m	POS	O	14/08/2018	O	14/08/2018	O	15/08/2018	O	02/09/2018	Ascite J18x2S
P340	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sebou Centre	9.3132703	2.491217	F	8m (acheté il y a 3 semaine s)	NEG									
P341	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sebou Centre	9.3132703	2.491217	M	8m (acheté il y a 3 semaine s)	NEG									
P342	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sebou Centre	9.3139773	2.490931	F	1y	NEG									
P343	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sebou Centre	9.3139773	2.490931	M	1y	NEG									
P344	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sebou Centre	9.3139773	2.490931	M	1y	NEG									
P345	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sebou Centre	9.3139773	2.490931	M	2y	NEG									
P346	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sebou Centre	9.3153059 15661156	2.491555335 0001574	F	6m	NEG									
P347	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sebou Centre	9.3153059 15661156	2.491555335 0001574	F	6m	NEG									
P348	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sebou Centre	9.3153059 15661156	2.491555335 0001574	F	1y	NEG									
P349	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sebou Centre	9.3146007 04237819	2.490084394 812584	F	6m	NEG									
P350	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sebou Centre	9.3146007 04237819	2.490084394 812584	F	6m	NEG									
P351	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sebou Centre	9.3146007 04237819	2.490084394 812584	F	7m	NEG									
P352	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sebou Centre	9.3146007 04237819	2.490084394 812584	F	7m	NEG									
P353	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sebou Centre	9.3146007 04237819	2.490084394 812584	M	8m	NEG									
P354	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sebou Centre	9.3125739	2.4905969	M	7m	POS	O	14/08/2018	O	14/08/2018	O	15/08/2018	O	28/08/2018	Ascite J13x1S
P355	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sebou Centre	9.3125739	2.4905969	F	6m	POS	N								
P356	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Barerou	9.3230434	2.5067088	F	6m	NEG									
P357	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Barerou	9.3230434	2.5067088	F	8m	NEG									
P358	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Barerou	9.3230434	2.5067088	F	1y	NEG									
P359	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Barerou	9.3230434	2.5067088	F	1y	NEG									
P360	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Barerou	9.3230434	2.5067088	M	6m	NEG									

P361	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Barerou	9.3238668 98193955	2.506162142 381072	F	1y	NEG
P362	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Barerou	9.3238668 98193955	2.506162142 381072	F	1y	NEG
P363	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Barerou	9.3238668 98193955	2.506162142 381072	F	1y	NEG
P364	03/08/2018	G. dom	O	Parakou	Barerou	9.3238668 98193955	2.506162142 381072	F	1y	NEG
P365	04/08/2018	G. dom	O	Parakou	Bassa	9.2844941	2.727548	F	3y	NEG
P366	04/08/2018	G. dom	O	Parakou	Bassa	9.2844941	2.727548	F	3y	NEG
P367	04/08/2018	G. dom	O	Parakou	Bassa	9.2844941	2.727548	F	7y	NEG
P368	04/08/2018	G. dom	O	Parakou	Bassa	9.2844941	2.727548	F	3y	NEG
P369	04/08/2018	G. dom	O	Parakou	Bassa	9.2844941	2.727548	F	6y	NEG
P370	04/08/2018	G. dom	O	Parakou	Bassa	9.2853502 09102035	2.726943735 0332737	F	5y	NEG
P371	04/08/2018	G. dom	O	Parakou	Bassa	9.2853502 09102035	2.726943735 0332737	F	5y	NEG
P372	04/08/2018	G. dom	O	Parakou	Bassa	9.2853502 09102035	2.726943735 0332737	F	1y	NEG
P373	04/08/2018	G. dom	O	Parakou	Bassa	9.2855839	2.7269007	F	1y	NEG
P374	04/08/2018	G. dom	O	Parakou	Bassa	9.2855839	2.7269007	F	1y	NEG
P375	04/08/2018	G. dom	O	Parakou	Bassa	9.2855839	2.7269007	F	1y	NEG
P376	04/08/2018	G. dom	O	Parakou	Bassa	9.290367	2.7300355	F	6m	NEG
P377	04/08/2018	G. dom	O	Parakou	Bassa	9.290367	2.7300355	F	6m	NEG
P378	04/08/2018	G. dom	O	Parakou	Bassa	9.290367	2.7300355	F	6m	NEG
P379	04/08/2018	G. dom	O	Parakou	Bassa	9.290367	2.7300355	M	6m	NEG
P380	04/08/2018	G. dom	O	Parakou	Bassa	9.2905258	2.7304134	F	2y	NEG
P381	04/08/2018	G. dom	O	Parakou	Bassa	9.2905258	2.7304134	F	1y	NEG
P382	04/08/2018	G. dom	O	Parakou	Bassa	9.2912396	2.7303364	F	1y 1/2	NEG
P383	04/08/2018	G. dom	O	Parakou	Bassa	9.2908357	2.7302508	F	8m	NEG
P384	04/08/2018	G. dom	O	Parakou	Bassa	9.2909713	2.7299182	F	1y (acheté il y a 2 mois)	NEG
P385	04/08/2018	G. dom	O	Parakou	Bassa	9.2909713	2.7299182	F	6m (acheté il y a 2 mois)	NEG
P386	04/08/2018	G. dom	O	Parakou	Bassa	9.2909713	2.7299182	F	6m (acheté il y a 2 mois)	NEG
P387	04/08/2018	G. dom	O	Parakou	Bassa	9.2918708 26855302	2.729865834 1169357	F	2y	NEG
P388	04/08/2018	G. dom	O	Parakou	Bassa	9.2918708 26855302	2.729865834 1169357	F	1y	NEG

P389	04/08/2018	G. dom	O	Parakou	Bassa	9.2919493	2.7292921	F	1y	NEG									
P390	04/08/2018	G. dom	O	Parakou	Bassa	9.2919493	2.7292921	F	2y	NEG									
P391	04/08/2018	G. dom	O	Parakou	Bassa	9.2917303	2.7294534	M	6m	NEG									
P392	04/08/2018	G. dom	O	Parakou	Bassa	9.2920744	2.7289862	F	6m	NEG									
P393	04/08/2018	G. dom	O	Parakou	Bassa	9.2920744	2.7289862	F	6m	NEG									
P394	04/08/2018	G. dom	O	Parakou	Bassa	9.290122	2.728089	F	8m	NEG									
P395	04/08/2018	G. dom	O	Parakou	Bassa	9.290122	2.728089	F	1y	NEG									
P396	05/08/2018	G. dom	O	Parakou	Ouenou	9.7890678	2.6357725	F	6m (acheté il y a 1 mois)	NEG									
P397	05/08/2018	G. dom	O	Parakou	Ouenou	9.7890678	2.6357725	F	5y	POS	N								
P398	05/08/2018	G. dom	O	Parakou	Ouenou	9.7890926	2.6360585	F	6m	NEG									
P399	05/08/2018	G. dom	O	Parakou	Ouenou	9.7901113	2.6362479	F	6m (acheté il y a 1 mois)	NEG									
P400	05/08/2018	G. dom	O	Parakou	Ouenou	9.7888746	2.6369975	M	3y	NEG									
P401	05/08/2018	G. dom	O	Parakou	Ouenou	9.788461	2.6359307	F	6m	NEG									
P402	05/08/2018	G. dom	O	Parakou	Ouenou	9.788461	2.6359307	F	6m	NEG									
P403	05/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sassoh 1	9.7687478	2.6537631	M	6m	NEG									
P404	05/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sassoh 1	9.7687478	2.6537631	M	6m	NEG									
P405	05/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sassoh 1	9.7687478	2.6537631	F	6m	NEG									
P406	05/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sassoh 1	9.7687478	2.6537631	F	6m	POS	O	14/08/2018	O	14/08/2018	O	15/08/2018	N		
P407	05/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sassoh 1	9.7687478	2.6537631	F	6m	NEG									
P408	05/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sassoh 1	9.7687478	2.6537631	F	1y	NEG									
P409	05/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sassoh 1	9.7687478	2.6537631	M	1y	NEG									
P410	05/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sassoh 2	9.764156	2.6593817	F	6m	NEG									
P411	05/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sassoh 2	9.764156	2.6593817	F	6m	NEG									
P412	05/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sassoh 2	9.764156	2.6593817	F	1y	NEG									
P413	05/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sassoh 2	9.764156	2.6593817	F	1y	NEG									
P414	05/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sassoh 2	9.764156	2.6593817	F	6m	NEG									
P415	05/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sassoh 2	9.764156	2.6593817	F	1y	NEG									
P416	05/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sassoh 2	9.764156	2.6593817	F	6m	NEG									
P417	06/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sinagourou	9.33132	2.6229757	F	6m	NEG									

P418	06/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sinagourou	9.33132	2.6229757	F	1y	POS	O	14/08/2018	O	14/08/2018	O	15/08/2018	O	01/09/2018	AJ17 x2
P419	06/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sinagourou	9.33132	2.6229757	F	6m	NEG									
P420	06/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sinagourou	9.3314837 01243997	2.622997909 784317	F	6m	NEG									
P421	06/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sinagourou	9.3314837 01243997	2.622997909 784317	F	2y	POS	O	14/08/2018	O	14/08/2018	O	15/08/2018	O	25/08/2018	Ascite J10x3S
P422	06/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sinagourou	9.3315788 7775451	2.623190442 1001673	F	6m	NEG									
P423	06/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sinagourou	9.3315788 7775451	2.623190442 1001673	F	6m	NEG									
P424	06/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sinagourou	9.3315788 7775451	2.623190442 1001673	F	6m	NEG									
P425	06/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sinagourou	9.3315788 7775451	2.623190442 1001673	M	1y	NEG									
P426	06/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sinagourou	9.3315788 7775451	2.623190442 1001673	F	6m	NEG									
P427	06/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sinagourou	9.3315788 7775451	2.623190442 1001673	F	6m	NEG									
P428	06/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sinagourou	9.3312787	2.6229564	F	6m	NEG									
P429	06/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sinagourou	9.3312787	2.6229564	F	1y	NEG									
P430	06/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sinagourou	9.3312787	2.6229564	F	1y	NEG									
P431	06/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sinagourou	9.3312787	2.6229564	F	2y	POS	N								
P432	06/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sinagourou	9.3312787	2.6229564	F	6m	NEG									
P433	06/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sinagourou	9.3312787	2.6229564	F	6m	POS	O	14/08/2018	O	14/08/2018	O	15/08/2018	N		
P434	06/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sinagourou	9.3312787	2.6229564	F	6m	NEG									
P435	06/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sinagourou	9.3312787	2.6229564	M	6m	NEG									
P436	06/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sinagourou	9.3312787	2.6229564	M	6m	NEG									
P437	06/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sinagourou	9.3309504	2.6228841	F	1y	NEG									
P438	06/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sinagourou	9.3309504	2.6228841	M	6m	NEG									
P439	06/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sinagourou	9.3309504	2.6228841	F	2y	NEG									
P440	06/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sinagourou	9.3309504	2.6228841	F	1y	NEG									
P441	06/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sinagourou	9.3309504	2.6228841	F	6m	NEG									
P442	06/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sinagourou	9.3309504	2.6228841	F	1y	NEG									
P443	06/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sinagourou	9.3311835	2.6232067	M	1y	NEG									
P444	06/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sinagourou	9.3311835	2.6232067	M	6m	NEG									
P445	06/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sinagourou	9.3311835	2.6232067	M	6m	NEG									
P446	06/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sinagourou	9.3311835	2.6232067	M	6m	NEG									
P447	06/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sinagourou	9.3311835	2.6232067	M	6m	NEG									
P448	06/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sinagourou	9.3311068	2.6232975	M	1y	NEG									

P449	06/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sinagourou	9.3311068	2.6232975	M	6m	NEG									
P450	06/08/2018	G. dom	O	Parakou	Sinagourou	9.3311068	2.6232975	F	6m	NEG									
P451	07/08/2018	G. dom	O	Parakou	Medina	9.3345242	2.6224561	M	1y	NEG									
P452	07/08/2018	G. dom	O	Parakou	Medina	9.3345242	2.6224561	M	1y	NEG									
P453	07/08/2018	G. dom	O	Parakou	Medina	9.3345242	2.6224561	F	2y	POS	O	14/08/2018	O	14/08/2018	O	15/08/2018	N		
P454	07/08/2018	G. dom	O	Parakou	Medina	9.3345242	2.6224561	F	2y	NEG									
P455	07/08/2018	G. dom	O	Parakou	Medina	9.3345242	2.6224561	F	1y	NEG									
P456	07/08/2018	G. dom	O	Parakou	Medina	9.3345242	2.6224561	M	1y	NEG									
P457	07/08/2018	G. dom	O	Parakou	Medina	9.3345242	2.6224561	F	1y	NEG									
P458	07/08/2018	G. dom	O	Parakou	Medina	9.3345242	2.6224561	F	1y	NEG									
P459	07/08/2018	G. dom	O	Parakou	Medina	9.3350656	2.6224626	F	1y	POS	O	14/08/2018	O	14/08/2018	O	15/08/2018	N		
P460	07/08/2018	G. dom	O	Parakou	Medina	9.3350656	2.6224626	F	1y	POS	N								
P461	07/08/2018	G. dom	O	Parakou	Medina	9.3350656	2.6224626	F	1y	POS	O	14/08/2018	O	14/08/2018	O	15/08/2018	N		
P462	07/08/2018	G. dom	O	Parakou	Medina	9.3350656	2.6224626	F	6m	NEG									
P463	07/08/2018	G. dom	O	Parakou	Medina	9.3350656	2.6224626	F	1y 1/2	POS	N								
P464	07/08/2018	G. dom	O	Parakou	Medina	9.3350656	2.6224626	F	9m	POS	N								
P465	07/08/2018	G. dom	O	Parakou	Medina	9.3342407	2.6229937	M	1y	NEG									
P466	07/08/2018	G. dom	O	Parakou	Medina	9.3342407	2.6229937	F	1y	NEG									
P467	07/08/2018	G. dom	O	Parakou	Medina	9.3342407	2.6229937	F	6m	NEG									
P468	07/08/2018	G. dom	O	Parakou	Medina	9.3342407	2.6229937	F	6m	NEG									
P469	07/08/2018	G. dom	O	Parakou	Medina	9.3342407	2.6229937	F	6m	NEG									
P470	07/08/2018	G. dom	O	Parakou	Medina	9.3344778 84694934	2.623012159 0197086	F	3y	POS	O	14/08/2018	O	14/08/2018	O	15/08/2018	O	29/08/2018	Ascite J14x1S
P471	07/08/2018	G. dom	O	Parakou	Medina	9.3344778 84694934	2.623012159 0197086	F	6m	NEG									
P472	07/08/2018	G. dom	O	Parakou	Medina	9.3344888	2.6229519	M	1y 1/2	NEG									
P473	07/08/2018	G. dom	O	Parakou	Medina	9.3344888	2.6229519	F	1y	NEG									
P474	07/08/2018	G. dom	O	Parakou	Medina	9.3344888	2.6229519	F	1y	NEG									
P475	07/08/2018	G. dom	O	Parakou	Medina	9.3344888	2.6229519	F	1y	NEG									
P476	07/08/2018	G. dom	O	Parakou	Medina	9.3344888	2.6229519	M	2y	NEG									
P477	07/08/2018	G. dom	O	Parakou	Medina	9.3342199	2.6228045	M	1y 1/2	NEG									
P478	07/08/2018	G. dom	O	Parakou	Medina	9.3342199	2.6228045	M	1y 1/2	NEG									
P479	07/08/2018	G. dom	O	Parakou	Medina	9.3334389	2.6217842	F	6m	NEG									

P480	07/08/2018	G. dom	O	Parakou	Medina	9.3334389	2.6217842	F	4y	NEG								
P481	07/08/2018	G. dom	O	Parakou	Medina	9.3334389	2.6217842	F	7m	NEG								
P482	07/08/2018	G. dom	O	Parakou	Medina	9.3334389	2.6217842	M	5y	NEG								
P483	08/08/2018	G. dom	O	Parakou	Gah	9.3435681	2.6240823	F	1y	NEG								
P484	08/08/2018	G. dom	O	Parakou	Gah	9.3435681	2.6240823	F	6m	NEG								
P485	08/08/2018	G. dom	O	Parakou	Gah	9.3435681	2.6240823	F	1y	NEG								
P486	08/08/2018	G. dom	O	Parakou	Gah	9.3435681	2.6240823	F	6m	NEG								
P487	08/08/2018	G. dom	O	Parakou	Gah	9.3435681	2.6240823	F	2y	POS	N							
P488	08/08/2018	G. dom	O	Parakou	Gah	9.3435681	2.6240823	M	1y	NEG								
P489	08/08/2018	G. dom	O	Parakou	Gah	9.3435681	2.6240823	F	1y 1/2	POS	O	14/08/2018	O	14/08/2018	O	15/08/2018	N	
P490	08/08/2018	G. dom	O	Parakou	Gah	9.3435681	2.6240823	F	1y	NEG								
P491	08/08/2018	G. dom	O	Parakou	Gah	9.3435681	2.6240823	M	1y 1/2	NEG								
P492	08/08/2018	G. dom	O	Parakou	Gah	9.3435681	2.6240823	M	1y	NEG								
P493	08/08/2018	G. dom	O	Parakou	Gah	9.3435681	2.6240823	M	6m	NEG								
P494	08/08/2018	G. dom	O	Parakou	Gah	9.3435681	2.6240823	F	6m	NEG								
P495	08/08/2018	G. dom	O	Parakou	Gah	9.3435681	2.6240823	F	1y	NEG								
P496	08/08/2018	G. dom	O	Parakou	Gah	9.3450925	2.624381	M	1y	NEG								
P497	08/08/2018	G. dom	O	Parakou	Gah	9.3450925	2.624381	F	1y	NEG								
P498	08/08/2018	G. dom	O	Parakou	Gah	9.3450925	2.624381	M	2y	NEG								
P499	08/08/2018	G. dom	O	Parakou	Gah	9.3450925	2.624381	F	6m	NEG								
P500	08/08/2018	G. dom	O	Parakou	Gah	9.3449348	2.6243438	M	7m	NEG								
P501	08/08/2018	G. dom	O	Parakou	Gah	9.3449348	2.6243438	F	3y	POS	N							
P502	08/08/2018	G. dom	O	Parakou	Gah	9.3449348	2.6243438	F	6m	NEG								
P503	08/08/2018	G. dom	O	Parakou	Gah	9.3449348	2.6243438	F	1y	NEG								
P504	08/08/2018	G. dom	O	Parakou	Gah	9.3449348	2.6243438	F	5y	NEG								
P505	08/08/2018	G. dom	O	Parakou	Gah	9.3449348	2.6243438	M	1y	POS	N							
P506	08/08/2018	G. dom	O	Parakou	Gah	9.3449348	2.6243438	M	6m	NEG								
P507	08/08/2018	G. dom	O	Parakou	Gah	9.3449348	2.6243438	F	2y	POS	O	14/08/2018	O	14/08/2018	O	15/08/2018	N	
P508	08/08/2018	G. dom	O	Parakou	Gah	9.3447531	2.624154	M	1y	POS	O	14/08/2018	O	14/08/2018	O	15/08/2018	N	
P509	08/08/2018	G. dom	O	Parakou	Gah	9.3447531	2.624154	F	2y	NEG								
P510	08/08/2018	G. dom	O	Parakou	Gah	9.3444455	2.6242731	F	1y	POS	N							

P511	08/08/2018	G. dom	O	Parakou	Gah	9.3444455	2.6242731	F	6m	POS	O	14/08/2018	O	14/08/2018	O	15/08/2018	N
P512	08/08/2018	G. dom	O	Parakou	Gah	9.3443839	2.6242496	F	1y 1/2	POS	N						
P513	08/08/2018	G. dom	O	Parakou	Gah	9.3443839	2.6242496	F	2y	POS	N						
P514	08/08/2018	G. dom	O	Parakou	Gah	9.3443839	2.6242496	F	1y	POS	O	14/08/2018	O	14/08/2018	O	15/08/2018	N
P515	08/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Batia 2	10.8808694	1.4866119	F	2y	NEG							
P516	08/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Batia 2	10.8808694	1.4866119	M	2y	NEG							
P517	08/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Batia 2	10.8808694	1.4866119	M	2y	NEG							
P518	08/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Batia 2	10.880334810353816	1.4867548272013664	M	1y	NEG							
P519	08/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Batia 2	10.8799526	1.4869073	F	2y	NEG							
P520	08/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Batia 2	10.8799526	1.4869073	F	2y	NEG							
P521	08/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Batia 2	10.8799526	1.4869073	M	2y	NEG							
P522	08/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Batia 2	10.8806426	1.4857395	F	1y	NEG							
P523	08/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Batia 2	10.8806426	1.4857395	F	2y	NEG							
P524	08/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Batia 2	10.8806426	1.4857395	F	1y	NEG							
P525	08/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Batia Peulh	10.8820267	1.4820395	F	1y	NEG							
P526	08/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Batia 1	10.9007156	1.4820395	F	1y	NEG							
P527	08/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Batia 1	10.9007156	1.4820395	F	2y	NEG							
P528	08/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Batia 1	10.900542	1.487984	F	2y	NEG							
P529	08/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Batia 1	10.900542	1.487984	F	2y	NEG							
P530	08/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Batia 1	10.9003291	1.4882696	F	1y	NEG							
P531	08/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Batia 1	10.899491985328496	1.4893995691090822	F	1y (Nigeria)	NEG							
P532	08/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Batia 1	10.9003093	1.4894736	M	1y	NEG							
P533	08/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Batia 1	10.9003093	1.4894736	F	1y	NEG							
P534	08/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Batia 1	10.9003093	1.4894736	M	1y	NEG							
P535	08/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Batia 1	10.9003093	1.4894736	F	1y 1/2	NEG							
P536	08/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Batia 1	10.9003093	1.4894736	F	7m	NEG							
P537	08/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Batia 1	10.9004817	1.4894959	M	9m	NEG							
P538	08/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Batia 1	10.9004817	1.4894959	F	9m	NEG							
P539	08/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Batia 1	10.9004817	1.4894959	F	9m	NEG							
P540	08/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Batia 1	10.8839393	1.4876878	M	5y	NEG							
P541	08/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Batia 1	10.8839393	1.4876878	F	7m	NEG							

P542	08/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Batia 1	10.883939 3	1.4876878	F	3m	NEG
P543	09/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tanguiéta	10.618818 1	2.2679018	F	8m mais acheté il y a 4 mois	NEG
P544	09/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tanguiéta	10.618818 1	2.2679018	F	2y acheté il y a 4 mois	NEG
P545	09/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tanguiéta	10.618818 1	2.2679018	F	1y	NEG
P546	09/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tanguiéta	10.618818 1	2.2679018	F	1y	NEG
P547	09/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tanguiéta	10.618818 1	2.2679018	M	1y 1/2	NEG
P548	09/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tanguiéta	10.618818 1	2.2679018	M	1y 1/2	NEG
P549	09/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tanguiéta	10.619114	1.2680273	F	6m	NEG
P550	09/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tanguiéta	10.619114	1.2680273	F	6m	NEG
P551	09/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tanguiéta	10.619114	1.2680273	F	6m	NEG
P552	09/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tanguiéta	10.619114	1.2680273	F	4m	NEG
P553	09/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tanguiéta	10.619114	1.2680273	M	7m	NEG
P554	09/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tanguiéta	10.619114	1.2680273	F	6m	NEG
P555	09/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tanguiéta	10.619114	1.2680273	F	1y	NEG
P556	09/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tanguiéta	10.619114	1.2680273	M	1y 1/2	NEG
P557	09/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tanguiéta	10.619114	1.2680273	F	6m	NEG
P558	09/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tanguiéta	10.619114	1.2680273	F	1y	NEG
P559	09/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tanguiéta	10.619114	1.2680273	F	1y	NEG
P560	09/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tanguiéta	10.619114	1.2680273	F	1y	NEG
P561	09/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tanguiéta	10.619114	1.2680273	F	6m	NEG
P562	09/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tanguiéta	10.618914 4	1.2684132	F	1y 1/2	NEG
P563	09/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tanguiéta	10.618914 4	1.2684132	F	1y 1/2	NEG
P564	09/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tanguiéta	10.618979 2	1.2687971	F	1y	NEG
P565	09/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tanguiéta	10.618979 2	1.2687971	F	6m	NEG
P566	09/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tanguiéta	10.619138 7	1.2676704	M	9m	NEG
P567	09/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tanguiéta	10.619194	1.2670966	F	4m	NEG
P568	09/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tanguiéta	10.619194	1.2670966	F	4m	NEG
P569	09/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tanguiéta	10.619194	1.2670966	F	4m	NEG
P570	09/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tanguiéta	10.619194	1.2670966	F	4m	NEG

P571	09/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tanguiéta	10.619587 088003755	1.266736825 928092	M	1y	NEG											
P572	09/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tanguiéta	10.619587 088003755	1.266736825 928092	F	1y	NEG											
P573	09/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tanguiéta	10.619587 088003755	1.266736825 928092	F	1y 1/2	NEG											
P574	09/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tanguiéta	10.619587 088003755	1.266736825 928092	F	1y 1/2	NEG											
P575	09/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tanguiéta	10.619720 6	1.2675332	F	6m	NEG											
P576	09/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tanguiéta	10.618487 7	1.2699189	F	1y	NEG											
P577	09/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tanguiéta	10.618487 7	1.2699189	F	6m	NEG											
P578	09/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tanguiéta	10.618262 2	1.2701616	F	8m	NEG											
P579	09/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tanguiéta	10.618262 2	1.2701616	F	6m	NEG											
P580	09/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tanguiéta	10.618262 2	1.2701616	F	1y 1/2	NEG											
P581	09/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tanguiéta	10.618198 667652905	1.270270803 9432764	F	1y	NEG											
P582	09/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tanguiéta	10.618198 667652905	1.270270803 9432764	F	1y	NEG											
P583	09/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tanguiéta	10.618198 667652905	1.270270803 9432764	F	6m	NEG											
P584	09/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tanguiéta	10.618198 667652905	1.270270803 9432764	F	1y	NEG											
P585	09/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tanguiéta	10.618198 667652905	1.270270803 9432764	M	10m	NEG											
P586	10/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Dassagaté	10.306526 14776045	1.386561580 002308	F	1y 1/2	NEG											
P587	10/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Dassagaté	10.306526 14776045	1.386561580 002308	F	1y	NEG											
P588	10/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Dassagaté	10.306526 14776045	1.386561580 002308	F	1y 1/2	POS	O		19/09/2018	O			O	20/09/2018	O	09/10/2018	Ascite J20x1
P589	10/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Dassagaté	10.306526 14776045	1.386561580 002308	F	1y 1/2	NEG											
P590	10/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Dassagaté	10.305807	1.3869969	M	9m	NEG											
P591	10/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Dassagaté	10.305807	1.3869969	F	9m	NEG											
P592	10/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Dassagaté	10.305807	1.3869969	F	1y	NEG											
P593	10/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Dassagaté	10.305807	1.3869969	M	1y	NEG											
P594	10/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Dassagaté	10.305807	1.3869969	F	1y	NEG											
P595	10/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Dassagaté	10.305807	1.3869969	F	1y	NEG											
P596	10/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Dassagaté	10.305692 9	1.3865565	F	1y	NEG											
P597	10/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Dassagaté	10.305692 9	1.3865565	F	1y	NEG											
P598	10/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Dassagaté	10.306051 690131426	1.387488534 6740484	F	9m	NEG											
P599	10/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Dassagaté	10.306519 9	1.3858066	F	1y 1/2	NEG											
P600	10/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Dassagaté	10.306519 9	1.3858066	F	2m	NEG											
P601	10/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Dassagaté	10.306519 9	1.3858066	F	2m 1/2	NEG											

P602	10/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Dassagaté	10.306519 9	1.3858066	F	5m	NEG									
P603	10/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Dassagaté	10.306519 9	1.3858066	F	1y	NEG									
P604	10/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Dassagaté	10.306519 9	1.3858066	F	2m 1/2	NEG									
P605	10/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Dassagaté	10.306519 9	1.3858066	F	8m	NEG									
P606	10/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Dassagaté	10.306519 9	1.3858066	F	2m	NEG									
P607	10/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Dassagaté	10.306519 9	1.3858066	F	3m	NEG									
P608	10/09/2018	A. platy	O	Natitingou	Dassagaté	10.306519 9	1.3858066	F	1y 1/2	POS	O	19/09/2018	O		O	20/09/2018	O	28/09/2018	Ascite J8x2S
P609	10/09/2018	A. platy	O	Natitingou	Dassagaté	10.306519 9	1.3858066	F	1y 1/2	NEG									
P610	10/09/2018	A. platy	O	Natitingou	Dassagaté	10.306519 9	1.3858066	F	1y 1/2	NEG									
P611	10/09/2018	A. platy	O	Natitingou	Dassagaté	10.306519 9	1.3858066	F	1y 1/2	NEG									
P612	10/09/2018	A. platy	O	Natitingou	Dassagaté	10.306519 9	1.3858066	F	1y 1/2	POS	N								N
P613	10/09/2018	A. platy	O	Natitingou	Dassagaté	10.306519 9	1.3858066	F	1y 1/2	NEG									
P614	10/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Dassagaté	10.306519 9	1.3858066	F	1y	NEG									
P615	10/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Dassagaté	10.306519 9	1.3858066	F	1y	NEG									
P616	10/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Dassagaté	10.306519 9	1.3858066	F	1y	NEG									
P617	10/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Dassagaté	10.306519 9	1.3858066	F	1y	NEG									
P618	10/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Dassagaté	10.307244	1.3870613	F	1y 1/2	NEG									
P619	10/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Dassagaté	10.307244	1.3870613	F	4y	NEG									
P620	10/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Dassagaté	10.306223 9	1.3846	F	1y 1/2	NEG									
P621	10/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Dassagaté	10.306223 9	1.3846	F	1y 1/2	NEG									
P622	10/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Dassagaté	10.306223 9	1.3846	F	1y 1/2	NEG									
P623	10/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Dassagaté	10.306223 9	1.3846	F	2y	NEG									
P624	10/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Dassagaté	10.306223 9	1.3846	F	4y	POS	N								N
P625	11/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tchirimina	10.303494 7	1.3722192	F	4y	NEG									
P626	11/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tchirimina	10.303494 7	1.3722192	F	1y (4m sur place)	POS	O	19/09/2018	O	19/09/2018	O	20/09/2018	O	01/10/2018	Ascite J11x2S
P627	11/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tchirimina	10.303494 7	1.3722192	F	8m	POS	O	19/09/2018	O	19/09/2018	O	20/09/2018	O	03/10/2018	Ascite J13x1S
P628	11/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tchirimina	10.303494 7	1.3722192	M	9m	NEG									
P629	11/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tchirimina	10.303494 7	1.3722192	F	1y 1/2	NEG									
P630	11/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tchirimina	10.303494 7	1.3722192	F	3y	POS	N								N
P631	11/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tchirimina	10.303494 7	1.3722192	F	1y 1/2	NEG									
P632	11/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tchirimina	10.303951 3	1.3721366	F	1y 1/2	NEG									

P633	11/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tchirimina	10.303951 3	1.3721366	F	8m	NEG									
P634	11/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tchirimina	10.303951 3	1.3721366	F	8m	POS	O	19/09/2018	O	19/09/2018	O	20/09/2018	N		
P635	11/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tchirimina	10.303951 3	1.3721366	F	1y	NEG									
P636	11/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tchirimina	10.303951 3	1.3721366	M	1y 1/2	NEG									
P637	11/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tchirimina	10.303951 3	1.3721366	F	2y	POS	O	19/09/2018	O	19/09/2018	O	20/09/2018	O	04/10/2018	Ascite J14x3S
P638	11/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tchirimina	10.303951 3	1.3721366	F	6m	NEG									
P639	11/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tchirimina	10.303951 3	1.3721366	M	8m	NEG									
P640	11/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tchirimina	10.303951 3	1.3721366	F	8m	POS	N								
P641	11/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tchirimina	10.303951 3	1.3721366	F	8m	POS	N								
P642	11/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tchirimina	10.303951 3	1.3721366	F	1y	NEG									
P643	11/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tchirimina	10.303951 3	1.3721366	F	2y	NEG									
P644	11/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tchirimina	10.303951 3	1.3721366	M	8m	NEG									
P645	11/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tchirimina	10.303951 3	1.3721366	F	5y	POS	N								
P646	11/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tchirimina	10.303951 3	1.3721366	F	5y	POS	N								
P647	11/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tchirimina	10.303951 3	1.3721366	F	5y	POS	O	19/09/2018	O	19/09/2018	O	20/09/2018	N		
P648	11/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tchirimina	10.303951 3	1.3721366	F	2y	NEG									
P649	11/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tchirimina	10.303951 3	1.3721366	M	6y	NEG									
P650	11/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tchirimina	10.303951 3	1.3721366	F	1y 1/2	POS	N								
P651	11/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tchirimina	10.303951 3	1.3721366	F	1y 1/2	NEG									
P652	11/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tchirimina	10.303971 8	1.3716612	F	1y	NEG									
P653	11/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tchirimina	10.304013 8	1.3716096	F	8m	NEG									
P654	11/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tchirimina	10.304013 8	1.3716096	M	1y	NEG									
P655	11/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tchirimina	10.304013 8	1.3716096	F	1y	POS	N								
P656	11/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tchirimina	10.304013 8	1.3716096	F	1y 1/2	POS	O	19/09/2018	O	19/09/2018	O	20/09/2018	O	02/10/2018	Ascite J12x3S
P657	11/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tchirimina	10.302274 6	1.3741101	F	1y	NEG									
P658	11/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tchirimina	10.302274 6	1.3741101	M	1y 1/2	NEG									
P659	11/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tchirimina	10.302274 6	1.3741101	F	9m	NEG									
P660	11/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tchirimina	10.302274 6	1.3741101	F	9m	NEG									
P661	11/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tchirimina	10.302274 6	1.3741101	F	1y	NEG									
P662	11/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tchirimina	10.302274 6	1.3741101	M	1y 1/2	NEG									
P663	11/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Tchirimina	10.302274 6	1.3741101	F	2y	NEG									

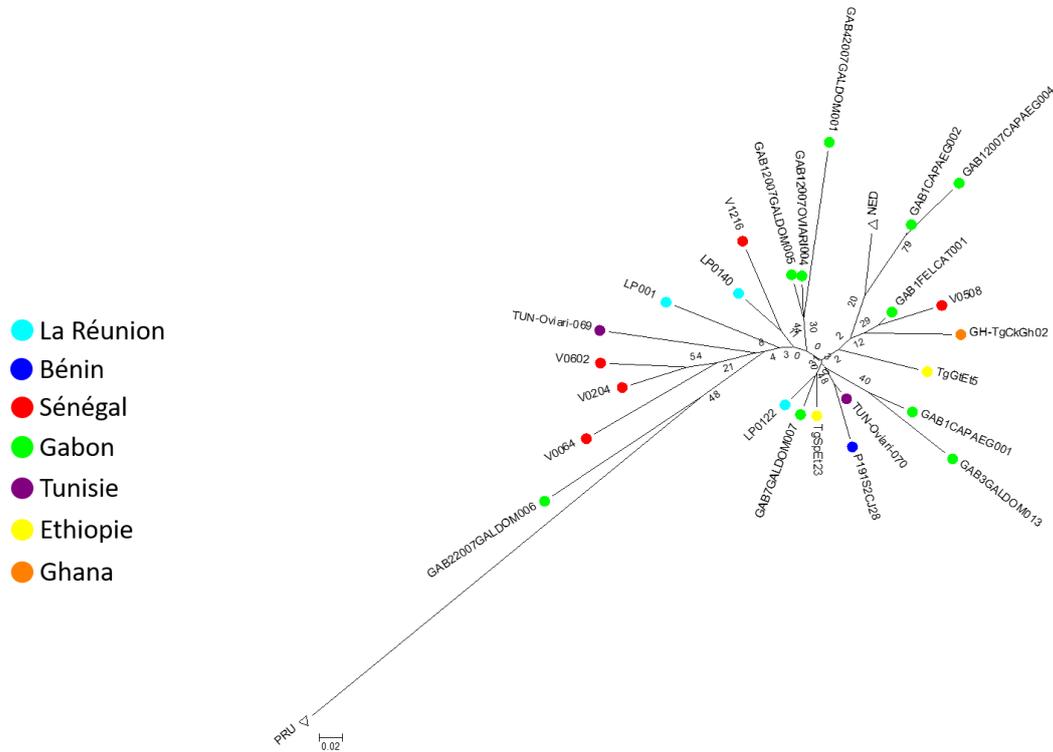
P664	12/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Boukoubé	10.183829	1.1005638	F	1y	POS	O	19/09/2018	O	19/09/2018	O	20/09/2018	N		
P665	12/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Boukoubé	10.183829	1.1005638	F	7m	POS	N		N						
P666	12/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Boukoubé	10.183829	1.1005638	M	2y	POS	N		N						
P667	12/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Boukoubé	10.18431	1.1002114	F	2y	POS	O	19/09/2018	O	19/09/2018	O	20/09/2018	O	19/10/2018	Cerveau x1S (0K)
P668	12/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Boukoubé	10.18431	1.1002114	F	7m	EQV	N		N						
P669	12/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Boukoubé	10.18431	1.1002114	F	1y	EQV	O	19/09/2018	O	19/09/2018	O	20/09/2018	O	19/10/2018	Cerveau x2S (0K)
P670	12/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Boukoubé	10.18431	1.1002114	M	1y 1/2	EQV	N		N						
P671	12/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Boukoubé	10.184255 5	1.0999912	F	9m	NEG									
P672	12/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Boukoubé	10.184255 5	1.0999912	F	9m	NEG									
P673	12/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Boukoubé	10.184255 5	1.0999912	M	4m	NEG									
P674	12/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Boukoubé	10.184504 1	1.1001209	M	2y	NEG									
P675	12/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Boukoubé	10.184572 977013886	1.100175250 3216267	F	2y	NEG									
P676	12/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Boukoubé	10.184572 977013886	1.100175250 3216267	F	1y 1/2	POS	O	19/09/2018	O	19/09/2018	O	20/09/2018	O	19/10/2018	Cerveau x3S (0K)
P677	12/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Boukoubé	10.184572 977013886	1.100175250 3216267	F	6y	NEG									
P678	12/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Boukoubé	10.184572 977013886	1.100175250 3216267	F	6m	NEG									
P679	12/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Boukoubé	10.184572 977013886	1.100175250 3216267	F	2y	NEG									
P680	12/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Boukoubé	10.184451 4	1.1003569	F	9m	POS	N		N						
P681	12/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Boukoubé	10.184451 4	1.1003569	F	9m	POS	N		N						
P682	12/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Boukoubé	10.184451 4	1.1003569	F	6m	POS	N		N						
P683	12/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Boukoubé	10.184451 4	1.1003569	F	9m	NEG									
P684	12/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Boukoubé	10.184451 4	1.1003569	F	3y	NEG									
P685	12/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Boukoubé	10.184451 4	1.1003569	F	1y	NEG									
P686	12/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Boukoubé	10.184552 7	1.0998341	F	1y	POS	N		N						
P687	12/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Boukoubé	10.183111 7	1.099562	F	1y	NEG									
P688	12/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Boukoubé	10.182556 8	1.0997121	M	2y	NEG									
P689	13/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Sossouna	10.325125 2	1.3836489	M	8m	NEG									
P690	13/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Sossouna	10.325125 2	1.3836489	F	8m	NEG									
P691	13/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Sossouna	10.324537 6	1.3822041	M	1y	NEG									
P692	13/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Sossouna	10.324537 6	1.3822041	F	6m	NEG									
P693	13/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Sossouna	10.324537 6	1.3822041	F	2y	NEG									
P694	13/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Sossouna	10.324537 6	1.3822041	F	1y	NEG									

P695	13/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Sossouna	10.324537 6	1.3822041	F	1y	NEG
P696	13/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Sossouna	10.324537 6	1.3822041	F	1y	NEG
P697	13/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Sossouna	10.324537 6	1.3822041	F	1y	NEG
P698	13/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Sossouna	10.324475 1	1.382432	F	1y 1/2	NEG
P699	13/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Sossouna	10.324475 1	1.382432	F	3y	NEG
P700	13/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Sossouna	10.324475 1	1.382432	M	2y	NEG
P701	13/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Sossouna	10.324475 1	1.382432	M	1y	NEG
P702	13/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Sossouna	10.324475 1	1.382432	F	1y	NEG
P703	13/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Sossouna	10.324475 1	1.382432	F	1y	NEG
P704	13/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Sossouna	10.324475 1	1.382432	F	1y	NEG
P705	13/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Sossouna	10.324475 1	1.382432	F	1y	NEG
P706	13/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Sossouna	10.327212 7	1.383546	F	1y	NEG
P707	13/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Sossouna	10.327212 7	1.383546	F	1y	NEG
P708	13/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Sossouna	10.327212 7	1.383546	M	1y	NEG
P709	13/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Sossouna	10.327212 7	1.383546	F	1y	NEG
P710	13/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Sossouna	10.327744 306996465	1.384791908 7857008	F	1y 1/2	NEG
P711	13/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Sossouna	10.327744 306996465	1.384791908 7857008	M	8m	NEG
P712	13/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Sossouna	10.327744 306996465	1.384791908 7857008	F	8m	NEG
P713	13/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Sossouna	10.327516 5	1.3847255	F	2y	NEG
P714	13/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Sossouna	10.327516 5	1.3847255	M	2y	NEG
P715	13/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Sossouna	10.327516 5	1.3847255	M	2y	NEG
P716	13/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Sossouna	10.327516 5	1.3847255	F	3y	NEG
P717	13/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Sossouna	10.327516 5	1.3847255	M	1y	NEG
P718	13/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Sossouna	10.327516 5	1.3847255	F	3y	NEG
P719	13/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Sossouna	10.327516 5	1.3847255	F	1y	NEG
P720	13/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Sossouna	10.327516 5	1.3847255	F	2y	NEG
P721	13/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Sossouna	10.331016	1.3844261	F	1y	NEG
P722	13/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Sossouna	10.331016	1.3844261	F	1y	NEG
P723	13/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Sossouna	10.331016	1.3844261	F	1y	NEG
P724	13/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Sossouna	10.330589 5	1.3834537	F	1y	NEG
P725	13/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Sossouna	10.330589 5	1.3834537	F	4m	NEG

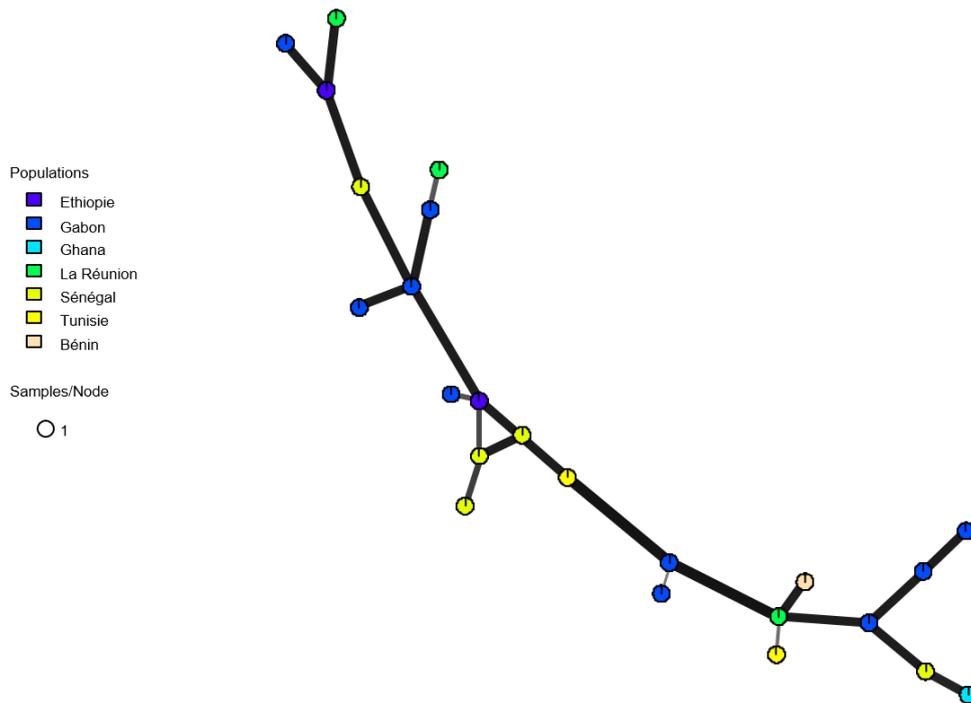
P726	13/09/2018	G. dom	O	Natitingou	Sossouna	10.330589 5	1.3834537	F	4m	NEG									
P727	24/09/2018	G. dom	O	Cotonou	Ayelawadjé	6.3844816 66666667	2.451688333 3333332	F	6m	NEG									
P728	24/09/2018	G. dom	O	Cotonou	Ayelawadjé	6.3847933 33333333	2.452021666 6666665	F	1y	NEG									
P729	24/09/2018	G. dom	O	Cotonou	Ayelawadjé	6.3847933 33333333	2.452021666 6666665	F	2m	NEG									
P730	24/09/2018	G. dom	O	Cotonou	Ayelawadjé	6.3837850 00000005	2.452626666 6666667	F	8m	POS	O	28/09/2018	O	28/09/2018	O	28/09/2018	O	05/10/2018	Ascite J7x1S
P731	24/09/2018	G. dom	O	Cotonou	Ayelawadjé	6.3837850 00000005	2.452626666 6666667	M	1y	POS	O	28/09/2018	O	28/09/2018	O	28/09/2018	O	05/10/2018	Ascite J7x3S
P732	24/09/2018	G. dom	O	Cotonou	Ayelawadjé	6.3877700 00000001	2.450448333 3333336	F	6m	NEG									
P733	24/09/2018	G. dom	O	Cotonou	Ayelawadjé	6.3877700 00000001	2.450448333 3333336	F	2y	NEG									
P734	24/09/2018	G. dom	O	Cotonou	Gbédgéwhin	6.3808083 33333325	2.446791666 666667	F	8m	NEG									
P735	24/09/2018	G. dom	O	Cotonou	Gbédgéwhin	6.3808083 33333325	2.446791666 666667	M	1y	NEG									
P736	24/09/2018	G. dom	O	Cotonou	Gbédgéwhin	6.3808083 33333325	2.446791666 666667	M	6m	NEG									
P737	24/09/2018	G. dom	O	Cotonou	Gbédgéwhin	6.3808083 33333325	2.446791666 666667	F	8m	NEG									
P738	24/09/2018	G. dom	O	Cotonou	Gbédgéwhin	6.3808083 33333325	2.446791666 666667	M	6m	NEG									
P739	24/09/2018	G. dom	O	Cotonou	Gbédgéwhin	6.3808083 33333325	2.446791666 666667	M	6m	POS	O	28/09/2018	O	28/09/2018	O	28/09/2018	O	05/10/2018	Ascite J7x2S
P740	24/09/2018	G. dom	O	Cotonou	Gbédgéwhin	6.3808083 33333325	2.446791666 666667	M	6m	NEG									
P741	24/09/2018	G. dom	O	Cotonou	Gbédgéwhin	6.3808083 33333325	2.446791666 666667	M	6m	NEG									
P742	25/09/2018	G. dom	O	Cotonou	Port	6.3514183 33333333	2.438173333 3333333	M	6m	NEG									
P743	25/09/2018	G. dom	O	Cotonou	Port	6.3514183 33333333	2.438173333 3333333	M	1y	NEG									
P744	25/09/2018	G. dom	O	Cotonou	Port	6.3514183 33333333	2.438173333 3333333	M	?	NEG									
P745	25/09/2018	G. dom	O	Cotonou	Port	6.3514183 33333333	2.438173333 3333333	M	1y	POS	N								
P746	25/09/2018	G. dom	O	Cotonou	Port	6.3514183 33333333	2.438173333 3333333	F	1y	POS	N								
P747	25/09/2018	G. dom	O	Cotonou	Port	6.3514183 33333333	2.438173333 3333333	F	1y	POS	O	28/09/2018	O	28/09/2018	O	28/09/2018	O	05/10/2018	Ascite J7x2S
P748	25/09/2018	G. dom	O	Cotonou	Port	6.3514183 33333333	2.438173333 3333333	M	9m	NEG									
P749	25/09/2018	G. dom	O	Cotonou	Port	6.3514183 33333333	2.438173333 3333333	M	6m	NEG									
P750	25/09/2018	G. dom	O	Cotonou	Tokpahoho	6.3583150 00000001	2.437361666 666667	M	1y	NEG									
P751	25/09/2018	G. dom	O	Cotonou	Tokpahoho	6.3583150 00000001	2.437361666 666667	M	1y 1/2	POS									
P752	25/09/2018	G. dom	O	Cotonou	Mimontin	6.3947699 99999999	2.366161666 6666667	M	6m	NEG									
P753	25/09/2018	G. dom	O	Cotonou	Mimontin	6.3947699 99999999	2.366161666 6666667	F	1y	NEG									
P754	25/09/2018	G. dom	O	Cotonou	Mimontin	6.3947699 99999999	2.366161666 6666667	M	6m	NEG									
P755	25/09/2018	G. dom	O	Cotonou	Mimontin	6.3947699 99999999	2.366161666 6666667	F	6m	POS	O	28/09/2018	O	28/09/2018	O	28/09/2018	O	04/10/2018	Ascite J6x3S
P756	25/09/2018	G. dom	O	Cotonou	Mimontin	6.3947699 99999999	2.366161666 6666667	F	8m	NEG									

P757	25/09/2018	G. dom	O	Cotonou	Mimontin	6.3947699 99999999	2.366161666 6666667	M	6m	NEG
P758	25/09/2018	G. dom	O	Cotonou	Mimontin	6.3947699 99999999	2.366161666 6666667	M	6m	NEG
P759	25/09/2018	G. dom	O	Cotonou	Mimontin	6.3947699 99999999	2.366161666 6666667	M	6m	NEG

Annexe 2. Analyses complémentaires en génétique des populations sur le Type III

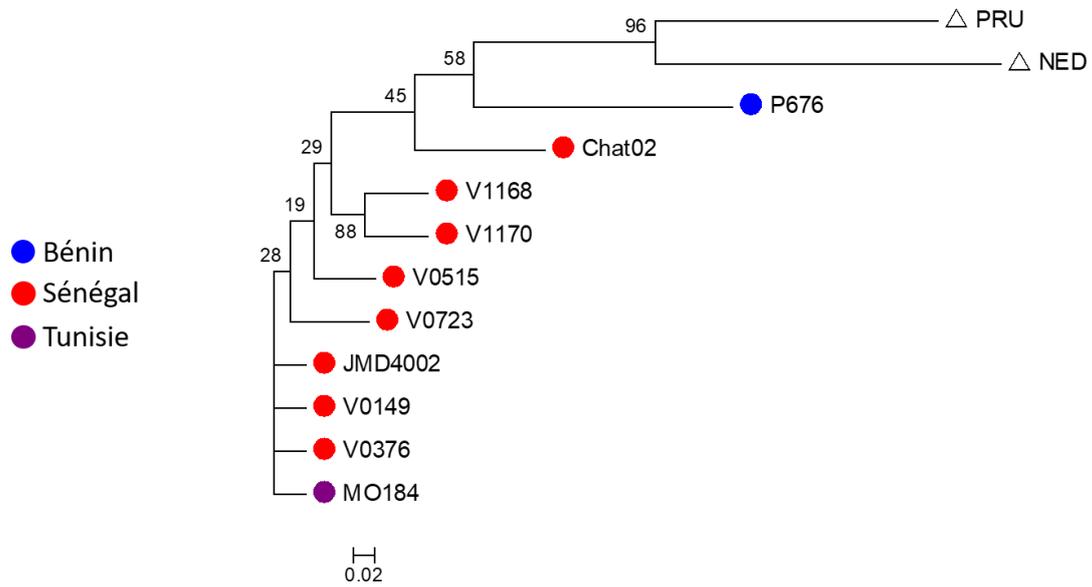


Arbre de Neighbor-Joining pour des souches Type III (CNR/CRB)

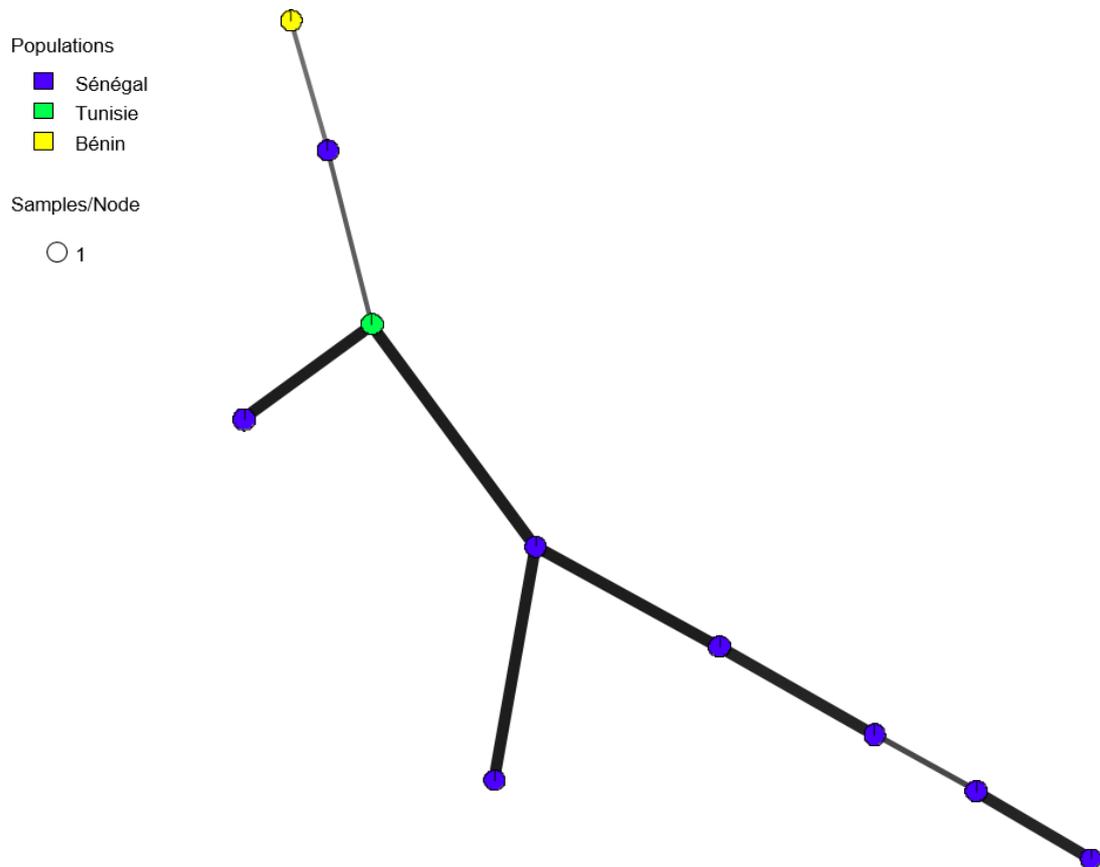


Réseau haplotypique de souches Type III (CNR/CRB)

Annexe 3. Analyses complémentaires en génétique des populations sur l’Africa 4



Arbre de Neighbor-Joining pour des souches Africa 4 (CNR/CRB)



Réseau haplotypique de souches Africa 4 (CNR/CRB)

Annexe 4. Echantillonnage sur rongeurs et autres micromammifères réalisé dans le cadre de l'étude de terrain au Bénin

N°	GENRE	Sexe	Age	Localité	qPCR sur broyat de cerveau	qPCR sur 30mg de coeur
GDOB0759	<i>Crocidura</i>	M	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0781	<i>Crocidura</i>	M	Adulte	Port	NEG	POS
GDOB0782	<i>Crocidura</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0783	<i>Crocidura</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0784	<i>Crocidura</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0785	<i>Crocidura</i>	F	Adulte	Port	NEG	POS
GDOB0786	<i>Crocidura</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0787	<i>Rattus norvegicus</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0788	<i>Rattus rattus</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0789	<i>Rattus rattus</i>	F	Juvenile	Port	NEG	NEG
GDOB0790	<i>Mastomys</i>	M	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0791	<i>Rattus rattus</i>	F	Juvenile	Port	NEG	NEG
GDOB0792	<i>Rattus rattus</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0793	<i>Rattus rattus</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0794	<i>Rattus rattus</i>	F	Juvenile	Port	NEG	NEG
GDOB0795	<i>Crocidura</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0796	<i>Crocidura</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0797	<i>Mastomys</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0798	<i>Crocidura</i>	M	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0799	<i>Rattus rattus</i>	M	Juvenile	Port	NEG	NEG
GDOB0800	<i>Crocidura</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0801	<i>Crocidura</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0802	<i>Rattus rattus</i>	M	Juvenile	Port	NEG	NEG
GDOB0803	<i>Rattus rattus</i>	F	Juvenile	Port	POS	NEG
GDOB0804	<i>Rattus rattus</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0805	<i>Rattus rattus</i>	M	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0806	<i>Rattus rattus</i>	F	Adulte	Port	POS	NEG
GDOB0807	<i>Rattus rattus</i>	M	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0808	<i>Rattus rattus</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG

GDOB0809	<i>Crocidura</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0810	<i>Crocidura</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0811	<i>Crocidura</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0812	<i>Crocidura</i>	M	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0813	<i>Crocidura</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0814	<i>Crocidura</i>	F	Adulte	Port	NEG	POS
GDOB0815	<i>Crocidura</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0816	<i>Crocidura</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0817	<i>Crocidura</i>	F	Adulte	Port	NEG	POS
GDOB0818	<i>Crocidura</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0819	<i>Crocidura</i>	F	Adulte	Port	NEG	POS
GDOB0820	<i>Crocidura</i>	M	Adulte	Port	NEG	POS
GDOB0821	<i>Crocidura</i>	M	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0822	<i>Crocidura</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0823	<i>Crocidura</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0824	<i>Crocidura</i>	F	Adulte	Port	POS	NEG
GDOB0825	<i>Crocidura</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0826	<i>Rattus rattus</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0827	<i>Rattus rattus</i>	M	Juvénile	Port	NEG	NEG
GDOB0828	<i>Rattus rattus</i>	M	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0829	<i>Rattus rattus</i>	M	Juvénile	Port	NEG	NEG
GDOB0830	<i>Rattus rattus</i>	M	Adulte	Port	POS	NEG
GDOB0831	<i>Rattus rattus</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0832	<i>Rattus rattus</i>	M	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0833	<i>Rattus rattus</i>	M	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0834	<i>Rattus rattus</i>	F	Adulte	Port	POS	NEG
GDOB0835	<i>Rattus rattus</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0836	<i>Rattus rattus</i>	M	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0837	<i>Crocidura</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0838	<i>Crocidura</i>	M	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0839	<i>Crocidura</i>	F	Adulte	Port	POS	NEG
GDOB0840	<i>Crocidura</i>	M	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0841	<i>Mus</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0842	<i>Mus</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0843	<i>Mus</i>	M	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0844	<i>Mus</i>	M	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0845	<i>Crocidura</i>	M	Adulte	Port	POS	NEG
GDOB0846	<i>Mus</i>	F	Adulte	Port	POS	NEG

GDOB0847	<i>Mus</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0848	<i>Mus</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0849	<i>Mus</i>	F	Adulte	Port	POS	NEG
GDOB0850	<i>Mus</i>	F	Juvenile	Port	NEG	NEG
GDOB0851	<i>Mus</i>	M	Juvenile	Port	NEG	NEG
GDOB0852	<i>Mus</i>	F	Adulte	Port	POS	NEG
GDOB0853	<i>Crocidura</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0854	<i>Rattus norvegicus</i>	F	Juvenile	Port	POS	NEG
GDOB0855	<i>Rattus norvegicus</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0856	<i>Crocidura</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0857	<i>Rattus norvegicus</i>	M	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0858	<i>Rattus norvegicus</i>	M	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0859	<i>Rattus norvegicus</i>	M	Juvenile	Port	NEG	NEG
GDOB0860	<i>Rattus norvegicus</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0861	<i>Mus</i>	M	Adulte	Port	POS	NEG
GDOB0862	<i>Mus</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0863	<i>Mus</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0864	<i>Mus</i>	M	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0865	<i>Mus</i>	M	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0866	<i>Mus</i>	F	Juvenile	Port	NEG	NEG
GDOB0867	<i>Mus</i>	F	Adulte	Port	POS	NEG
GDOB0868	<i>Mus</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0869	<i>Mus</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0870	<i>Rattus norvegicus</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0871	<i>Mus</i>	F	Adulte	Port	POS	NEG
GDOB0872	<i>Mus</i>	M	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0873	<i>Mus</i>	M	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0874	<i>Mus</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0875	<i>Mus</i>	M	Juvenile	Port	POS	NEG
GDOB0876	<i>Mus</i>	M	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0877	<i>Mus</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0878	<i>Rattus norvegicus</i>	F	Juvenile	Port	NEG	POS
GDOB0879	<i>Rattus norvegicus</i>	M	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0880	<i>Mus</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0881	<i>Mus</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0882	<i>Rattus norvegicus</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0883	<i>Rattus norvegicus</i>	M	Adulte	Port	NEG	NEG

GDOB0884	<i>Rattus norvegicus</i>	M	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0885	<i>Rattus norvegicus</i>	M	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0886	<i>Mus</i>	M	Adulte	Port	NEG	POS
GDOB0887	<i>Mus</i>	M	Adulte	Port	NEG	POS
GDOB0888	<i>Mus</i>	M	Adulte	Port	NEG	POS
GDOB0889	<i>Mus</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0890	<i>Mus</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0891	<i>Mus</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0892	<i>Mus</i>	M	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0893	<i>Mus</i>	M	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0894	<i>Mus</i>	M	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0895	<i>Mus</i>	M	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0896	<i>Mus</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0897	<i>Rattus norvegicus</i>	M	Juvénile	Port	NEG	NEG
GDOB0898	<i>Mus</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0899	<i>Rattus norvegicus</i>	F	Adulte	Port	POS	NEG
GDOB0900	<i>Mus</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0901	<i>Mus</i>	F	Juvénile	Port	NEG	NEG
GDOB0902	<i>Rattus norvegicus</i>	M	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0904	<i>Mus</i>	M	Adulte	Port	POS	NEG
GDOB0905	<i>Mus</i>	F	Adulte	Port	NEG	POS
GDOB0906	<i>Mus</i>	M	Adulte	Port	POS	NEG
GDOB0907	<i>Mus</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0908	<i>Rattus norvegicus</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0909	<i>Mus</i>	M	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0910	<i>Mus</i>	M	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0911	<i>Mus</i>	M	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0912	<i>Mus</i>	M	Adulte	Port	POS	NEG
GDOB0913	<i>Rattus norvegicus</i>	F	Juvénile	Port	NEG	POS
GDOB0914	<i>Mus</i>	M	Adulte	Port	POS	NEG
GDOB0915	<i>Rattus norvegicus</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0916	<i>Rattus norvegicus</i>	M	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB0917	<i>Rattus norvegicus</i>	M	Juvénile	Port	NEG	NEG
GDOB0918	<i>Crocidura</i>	F	Adulte	Agla	POS	POS
GDOB0919	<i>Crocidura</i>	M	Adulte	Agla	NEG	NEG
GDOB0920	<i>Crocidura</i>	F	Adulte	Agla	NEG	NEG
GDOB0921	<i>Rattus rattus</i>	M	Adulte	Agla	NEG	NEG
GDOB0922	<i>Crocidura</i>	F	Adulte	Agla	NEG	NEG

GDOB0923	<i>Crocidura</i>	F	Adulte	Agla	NEG	NEG
GDOB0924	<i>Crocidura</i>	M	Adulte	Agla	NEG	NEG
GDOB0925	<i>Rattus rattus</i>	F	Juvénile	Agla	NEG	NEG
GDOB0926	<i>Rattus norvegicus</i>	M	Adulte	Agla	NEG	NEG
GDOB0927	<i>Rattus norvegicus</i>	F	Adulte	Agla	NEG	NEG
GDOB0928	<i>Rattus norvegicus</i>	F	Adulte	Agla	NEG	NEG
GDOB0929	<i>Rattus rattus</i>	F	Adulte	Agla	NEG	NEG
GDOB0930	<i>Rattus rattus</i>	M	Adulte	Agla	NEG	NEG
GDOB0931	<i>Rattus rattus</i>	F	Adulte	Agla	NEG	NEG
GDOB0932	<i>Rattus rattus</i>	M	Adulte	Agla	NEG	NEG
GDOB0933	<i>Rattus rattus</i>	F	Adulte	Agla	NEG	NEG
GDOB0934	<i>Rattus rattus</i>	F	Juvénile	Agla	NEG	NEG
GDOB0935	<i>Mastomys</i>	F	Adulte	Agla	NEG	NEG
GDOB0936	<i>Mastomys</i>	F	Adulte	Agla	NEG	NEG
GDOB0937	<i>Rattus rattus</i>	F	Adulte	Agla	NEG	NEG
GDOB0938	<i>Rattus rattus</i>	F	Juvénile	Agla	NEG	NEG
GDOB0939	<i>Mastomys</i>	F	Juvénile	Agla	NEG	NEG
GDOB0940	<i>Crocidura</i>	F	Adulte	Agla	NEG	NEG
GDOB0941	<i>Crocidura</i>	M	Adulte	Agla	NEG	NEG
GDOB0942	<i>Crocidura</i>	M	Adulte	Agla	NEG	NEG
GDOB0943	<i>Mastomys</i>	M	Adulte	Agla	NEG	NEG
GDOB0944	<i>Crocidura</i>	F	Adulte	Agla	NEG	NEG
GDOB0945	<i>Rattus rattus</i>	F	Juvénile	Agla	POS	NEG
GDOB0946	<i>Rattus rattus</i>	M	Juvénile	Agla	NEG	NEG
GDOB0947	<i>Rattus rattus</i>	M	Juvénile	Agla	NEG	NEG
GDOB0948	<i>Rattus rattus</i>	M	Juvénile	Agla	NEG	NEG
GDOB0949	<i>Rattus norvegicus</i>	F	Adulte	Agla	POS	NEG
GDOB0950	<i>Rattus rattus</i>	F	Adulte	Agla	NEG	NEG
GDOB0951	<i>Rattus rattus</i>	F	Juvénile	Agla	NEG	NEG
GDOB0952	<i>Crocidura</i>	M	Adulte	Agla	NEG	NEG
GDOB0953	<i>Crocidura</i>	M	Adulte	Agla	NEG	NEG
GDOB0954	<i>Crocidura</i>	M	Adulte	Agla	POS	POS

GDOB0955	<i>Rattus rattus</i>	F	Adulte	Agla	NEG	NEG
GDOB0956	<i>Rattus rattus</i>	F	Adulte	Agla	NEG	NEG
GDOB0957	<i>Rattus norvegicus</i>	M	Adulte	Agla	NEG	NEG
GDOB0958	<i>Rattus rattus</i>	F	Adulte	Agla	NEG	NEG
GDOB0959	<i>Rattus rattus</i>	F	Adulte	Agla	NEG	NEG
GDOB0960	<i>Rattus rattus</i>	M	Juvénile	Agla	NEG	NEG
GDOB0961	<i>Rattus rattus</i>	M	Adulte	Agla	NEG	POS
GDOB0962	<i>Mastomys</i>	M	Adulte	Agla	NEG	NEG
GDOB0963	<i>Rattus rattus</i>	M	Juvénile	Agla	POS	NEG
GDOB0964	<i>Rattus rattus</i>	M	Juvénile	Agla	NEG	NEG
GDOB0965	<i>Rattus rattus</i>	M	Juvénile	Agla	NEG	NEG
GDOB0966	<i>Rattus rattus</i>	M	Juvénile	Agla	NEG	NEG
GDOB0967	<i>Rattus rattus</i>	M	Juvénile	Agla	NEG	NEG
GDOB0968	<i>Crocidura</i>	F	Adulte	Ladji	NEG	NEG
GDOB0969	<i>Crocidura</i>	M	Adulte	Ladji	POS	NEG
GDOB0970	<i>Crocidura</i>	F	Adulte	Ladji	NEG	NEG
GDOB0971	<i>Crocidura</i>	M	Adulte	Ladji	NEG	NEG
GDOB0972	<i>Rattus rattus</i>	M	Adulte	Ladji	NEG	NEG
GDOB0973	<i>Rattus rattus</i>	F	Adulte	Ladji	NEG	NEG
GDOB0974	<i>Rattus rattus</i>	M	Adulte	Ladji	NEG	NEG
GDOB0975	<i>Rattus rattus</i>	F	Adulte	Ladji	NEG	POS
GDOB0976	<i>Rattus rattus</i>	F	Juvénile	Ladji	NEG	NEG
GDOB0977	<i>Rattus rattus</i>	M	Juvénile	Ladji	NEG	NEG
GDOB0978	<i>Mastomys</i>	F	Adulte	Ladji	POS	NEG
GDOB0979	<i>Rattus rattus</i>	M	Adulte	Ladji	NEG	NEG
GDOB0980	<i>Rattus rattus</i>	M	Adulte	Ladji	POS	NEG
GDOB0981	<i>Rattus rattus</i>	M	Adulte	Ladji	NEG	NEG
GDOB0982	<i>Rattus rattus</i>	F	Juvénile	Ladji	NEG	NEG
GDOB0983	<i>Rattus rattus</i>	F	Juvénile	Ladji	NEG	NEG

GDOB0984	<i>Rattus rattus</i>	F	Juvénile	Ladji	NEG	NEG
GDOB0985	<i>Rattus norvegicus</i>	F	Adulte	Ladji	NEG	NEG
GDOB0986	<i>Rattus norvegicus</i>	F	Adulte	Ladji	NEG	POS
GDOB0987	<i>Crocidura</i>	F	Adulte	Ladji	POS	NEG
GDOB0988	<i>Crocidura</i>	F	Adulte	Ladji	NEG	NEG
GDOB0989	<i>Crocidura</i>	F	Adulte	Ladji	NEG	NEG
GDOB0990	<i>Crocidura</i>	M	Adulte	Ladji	NEG	NEG
GDOB0991	<i>Rattus rattus</i>	M	Juvénile	Ladji	NEG	NEG
GDOB0992	<i>Crocidura</i>	M	Adulte	Ladji	NEG	NEG
GDOB0993	<i>Rattus rattus</i>	F	Juvénile	Ladji	NEG	NEG
GDOB0994	<i>Rattus rattus</i>	F	Juvénile	Ladji	NEG	NEG
GDOB0995	<i>Crocidura</i>	F	Adulte	Ladji	NEG	NEG
GDOB0996	<i>Rattus rattus</i>	M	Juvénile	Ladji	NEG	NEG
GDOB0997	<i>Mastomys</i>	F	Adulte	Ladji	NEG	NEG
GDOB0998	<i>Rattus rattus</i>	F	Juvénile	Ladji	NEG	NEG
GDOB0999	<i>Rattus rattus</i>	F	Juvénile	Ladji	POS	NEG
GDOB1000	<i>Crocidura</i>	M	Adulte	Ladji	POS	POS
GDOB1001	<i>Rattus rattus</i>	M	Juvénile	Ladji	NEG	NEG
GDOB1002	<i>Rattus rattus</i>	M	Juvénile	Ladji	NEG	NEG
GDOB1003	<i>Rattus rattus</i>	F	Juvénile	Ladji	NEG	NEG
GDOB1004	<i>Crocidura</i>	F	Adulte	Ladji	NEG	NEG
GDOB1005	<i>Crocidura</i>	M	Adulte	Ladji	NEG	NEG
GDOB1006	<i>Rattus rattus</i>	F	Juvénile	Ladji	NEG	NEG
GDOB1007	<i>Rattus norvegicus</i>	M	Adulte	Ladji	NEG	NEG
GDOB1008	<i>Rattus rattus</i>	F	Adulte	Ladji	NEG	NEG
GDOB1009	<i>Rattus rattus</i>	M	Adulte	Ladji	NEG	NEG
GDOB1010	<i>Crocidura</i>	M	Adulte	Ladji	POS	POS
GDOB1011	<i>Rattus rattus</i>	F	Juvénile	Ladji	NEG	NEG
GDOB1012	<i>Mastomys</i>	M	Adulte	Ladji	NEG	NEG
GDOB1013	<i>Rattus rattus</i>	M	Adulte	Ladji	NEG	NEG
GDOB1014	<i>Rattus rattus</i>	F	Juvénile	Ladji	NEG	NEG
GDOB1015	<i>Rattus rattus</i>	F	Adulte	Ladji	NEG	NEG

GDOB1016	<i>Crocidura</i>	F	Adulte	Ladji	NEG	NEG
GDOB1017	<i>Rattus rattus</i>	F	Adulte	Ladji	NEG	NEG
GDOB1018	<i>Rattus norvegicus</i>	F	Adulte	Ladji	NEG	NEG
GDOB1019	<i>Crocidura</i>	F	Adulte	Ladji	NEG	NEG
GDOB1020	<i>Rattus rattus</i>	M	Juvénile	Saint Jean	NEG	NEG
GDOB1021	<i>Rattus rattus</i>	F	Adulte	Saint Jean	NEG	NEG
GDOB1022	<i>Mastomys</i>	M	Adulte	Saint Jean	NEG	NEG
GDOB1023	<i>Rattus rattus</i>	F	Adulte	Saint Jean	NEG	NEG
GDOB1024	<i>Rattus rattus</i>	M	Juvénile	Saint Jean	NEG	NEG
GDOB1025	<i>Rattus rattus</i>	M	Juvénile	Saint Jean	NEG	NEG
GDOB1026	<i>Rattus rattus</i>	M	Adulte	Saint Jean	NEG	NEG
GDOB1027	<i>Mastomys</i>	M	Adulte	Saint Jean	NEG	NEG
GDOB1028	<i>Rattus rattus</i>	M	Juvénile	Saint Jean	NEG	NEG
GDOB1029	<i>Crocidura</i>	M	Adulte	Saint Jean	NEG	NEG
GDOB1030	<i>Rattus rattus</i>	F	Juvénile	Saint Jean	NEG	NEG
GDOB1031	<i>Rattus rattus</i>	F	Juvénile	Saint Jean	NEG	NEG
GDOB1032	<i>Cricetomys</i>	M	Adulte	Saint Jean	NEG	NEG
GDOB1033	<i>Rattus rattus</i>	F	Juvénile	Saint Jean	NEG	NEG
GDOB1034	<i>Crocidura</i>	M	Adulte	Saint Jean	NEG	NEG
GDOB1035	<i>Crocidura</i>	F	Adulte	Saint Jean	POS	NEG
GDOB1036	<i>Crocidura</i>	M	Adulte	Saint Jean	NEG	NEG
GDOB1037	<i>Crocidura</i>	F	Adulte	Saint Jean	NEG	NEG
GDOB1038	<i>Crocidura</i>	M	Adulte	Saint Jean	NEG	NEG
GDOB1039	<i>Crocidura</i>	F	Adulte	Saint Jean	NEG	NEG
GDOB1040	<i>Rattus rattus</i>	F	Juvénile	Saint Jean	NEG	NEG
GDOB1041	<i>Mastomys</i>	F	Adulte	Saint Jean	NEG	NEG
GDOB1042	<i>Rattus rattus</i>	F	Juvénile	Saint Jean	NEG	NEG
GDOB1043	<i>Rattus rattus</i>	F	Juvénile	Saint Jean	NEG	NEG
GDOB1044	<i>Rattus rattus</i>	M	Juvénile	Saint Jean	NEG	NEG
GDOB1045	<i>Rattus rattus</i>	M	Juvénile	Saint Jean	NEG	NEG
GDOB1046	<i>Rattus rattus</i>	M	Adulte	Saint Jean	NEG	NEG
GDOB1047	<i>Rattus rattus</i>	F	Adulte	Saint Jean	NEG	NEG
GDOB1048	<i>Cricetomys</i>	M	Adulte	Saint Jean	NEG	NEG

GDOB1049	<i>Cricetomys</i>	M	Adulte	Saint Jean	NEG	NEG
GDOB1050	<i>Rattus rattus</i>	F	Juvenile	Saint Jean	NEG	NEG
GDOB1051	<i>Rattus rattus</i>	M	Juvenile	Saint Jean	NEG	NEG
GDOB1052	<i>Rattus rattus</i>	F	Juvenile	Saint Jean	NEG	NEG
GDOB1053	<i>Crocidura</i>	M	Adulte	Saint Jean	POS	NEG
GDOB1054	<i>Rattus rattus</i>	F	Juvenile	Saint Jean	NEG	NEG
GDOB1055	<i>Rattus rattus</i>	F	Juvenile	Saint Jean	NEG	NEG
GDOB1056	<i>Mastomys</i>	M	Juvenile	Saint Jean	NEG	NEG
GDOB1057	<i>Mastomys</i>	F	Adulte	Saint Jean	POS	NEG
GDOB1058	<i>Praomys</i>	F		Saint Jean	NEG	NEG
GDOB1059	<i>Rattus rattus</i>	M	Juvenile	Saint Jean	NEG	NEG
GDOB1060	<i>Rattus rattus</i>	F	Juvenile	Saint Jean	NEG	NEG
GDOB1061	<i>Rattus rattus</i>	M	Adulte	Saint Jean	NEG	NEG
GDOB1062	<i>Rattus rattus</i>	F	Adulte	Saint Jean	NEG	NEG
GDOB1063	<i>Crocidura</i>	F	Adulte	Saint Jean	NEG	NEG
GDOB1064	<i>Cricetomys</i>	F	Adulte	Saint Jean	NEG	NEG
GDOB1065	<i>Cricetomys</i>	M	Juvenile	Saint Jean	NEG	NEG
GDOB1066	<i>Crocidura</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB1067	<i>Mus</i>	F	Adulte	Port	POS	NEG
GDOB1068	<i>Mus</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB1069	<i>Mus</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB1070	<i>Rattus rattus</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB1071	<i>Mus</i>	M	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB1072	<i>Rattus rattus</i>	M	Juvenile	Port	NEG	NEG
GDOB1073	<i>Mus</i>	F	Adulte	Port	POS	NEG
GDOB1074	<i>Rattus norvegicus</i>	M	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB1075	<i>Rattus rattus</i>	F	Adulte	Port	POS	NEG
GDOB1076	<i>Rattus rattus</i>	M	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB1077	<i>Rattus norvegicus</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB1078	<i>Rattus rattus</i>	M	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB1079	<i>Rattus rattus</i>	M	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB1080	<i>Rattus rattus</i>	F	Adulte	Port	NEG	POS
GDOB1081	<i>Crocidura</i>	M	Adulte	Port	NEG	NEG

GDOB1082	<i>Rattus rattus</i>	M	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB1083	<i>Rattus rattus</i>	F	Adulte	Port	POS	NEG
GDOB1084	<i>Rattus rattus</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB1085	<i>Mus</i>	M	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB1086	<i>Mus</i>	M	Adulte	Port	POS	NEG
GDOB1087	<i>Mus</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB1088	<i>Mus</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB1089	<i>Mastomys</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB1090	<i>Mus</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB1254	<i>Crocidura</i>	F	Adulte	Saint Jean	NEG	NEG
GDOB1266	<i>Crocidura</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB1267	<i>Crocidura</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB1268	<i>Crocidura</i>	F	Adulte	Port	POS	POS
GDOB1269	<i>Crocidura</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB1270	<i>Crocidura</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB1271	<i>Rattus rattus</i>	M	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB1272	<i>Rattus rattus</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB1273	<i>Rattus rattus</i>	F	Juvénile	Port	NEG	NEG
GDOB1274	<i>Rattus rattus</i>	M	Juvénile	Port	NEG	NEG
GDOB1275	<i>Rattus rattus</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB1276	<i>Rattus rattus</i>	M	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB1277	<i>Rattus rattus</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB1278	<i>Rattus rattus</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB1279	<i>Rattus rattus</i>	M	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB1280	<i>Rattus rattus</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB1281	<i>Rattus rattus</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB1282	<i>Rattus rattus</i>	M	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB1283	<i>Rattus rattus</i>	F	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB1284	<i>Rattus rattus</i>	M	Adulte	Port	NEG	NEG
GDOB1285	<i>Rattus rattus</i>	M	Adulte	Port	NEG	NEG

Annexe 5. Script Poppr

```
library(poppr)

GE<- read.genepop("file.gen", ncode=3L, quiet=FALSE)

# nb de MLG

mlg(GE)

# Returns a diversity table by population (explications p 89 du tutoriel)

poppr(GE, sample=1000, total=FALSE)

# UPGMA tree

bruvo.boot(GE, sample=1000)

# Produces minimum spanning networks based off Bruvos distance colored by
population

bruvo.msn(GE, replen = 1, add = TRUE, loss = TRUE, mlg.compute = "original",
palette = topo.colors, sublist = "All", blacklist = NULL, vertex.label =
"inds", gscale = TRUE, glim = c(0, 0.8), gadj = 3, gweight = 1, wscale =
TRUE, showplot = TRUE, include.ties = FALSE, threshold = NULL,
clustering.algorithm = NULL)

#diversity after rarefaction

diversity_ci(GE, n = 1000, n.boot = 1L, ci = 95, total = FALSE, rarefy =
TRUE, n.rare = 14, plot = TRUE, raw = TRUE, center = TRUE)

# private alleles

private_alleles(GE, form = alleles ~ ., report = "table", level =
"population", count.alleles = TRUE, drop = FALSE)

# Perform a bootstrap analysis on diversity statistics

diversity_boot(GE, 1000, n.boot = 1L, n.rare = 7, H = TRUE, G = TRUE, lambda
= TRUE, E5 = TRUE)

# determining the minimum number of loci necessary to discriminate between
individuals in a population.

genotype_curve(GE, sample = 100, maxloci = 0L, quiet = FALSE, thresh = 1,
plot = TRUE, drop = TRUE, dropna = TRUE)
```

Annexe 6. Script simPLOT

```
setwd("C:/file_directory")
knitr::opts_chunk$set(tidy = FALSE, message = FALSE)
library(seqcombo)
library(tibble)
library(emojifont)
library(ggplot2)
library(plyr)
library(reshape2) #A library to reshape data.frames
library(ggrepel)
fas <- system.file("file.fst", package="seqcombo", pattern="fas",
full.names=TRUE)
fas
# annotation carte du genome
annotation <- read.csv("chromosome_annotation_file.csv", h=T, sep=";")
annotation_gene <- subset(annotation, Type=="Gene")
annotation.sub <- subset(annotation, Minimum > 7500 & Maximum < 10035)
require(grid)
library(gridExtra)
library(cowplot)
library(wesanderson)
# simplot sans groupe - individuel, seq by seq
simplot <- simplot("file.fst", 'ref_file', window = 10000, step = 5000, group
= FALSE)
simplot <- simplot + geom_hline(yintercept=0.998, linetype="dashed",
color="pink")
simplot <- simplot + theme(axis.text.x = element_blank())
simplot
map <- ggplot()
#map <- map + theme_bw(base_size =12)
#map <- map + guides(color=FALSE) #you can delete legend section according
to aes()
#p1 <- p1 + theme(legend.position = "none")
```

```

map <- map + geom_rect(data=annotation, aes(ymin=0, ymax=0.05, xmin=Minimum,
xmax=Maximum, fill=Name), color="grey")
map <- map + guides(fill=guide_legend(ncol=1))
# Remove axis ticks and tick mark labels
map <- map + theme(legend.position=c(0.99,0.3),
# axis.text.x = element_blank(), # Remove x axis tick labels
axis.text.y = element_blank(), # Remove y axis tick labels
axis.ticks.y = element_blank()) # Remove ticks
map

# combiner des éléments graphiques :
# http://www.sthda.com/french/wiki/ggplot2-combiner-plusieurs-graphiques-sur-la-m-me-page-logiciel-r-et-visualisation-de-donn-es
# combiner les deux plots avec cowplot : simpliste
# plot_grid(simplot, map, labels=c("A", "B"), ncol = 2, nrow = 1)

# combiner les plots en gérant leur position
simplotmap <- ggdraw() +
draw_plot(map, 0.03, 0.03, 0.95, 0.08) +
draw_plot(simplot, 0, 0.1, 0.99, 0.98) +
# draw_plot(simplot, 0, .1, 1, 1) +
draw_plot_label(c("TgCatBr09", "Genome Toxo"), c(0, 0), c(0.98, 0.2), size
= 15)
simplotmap
save_plot("file.pdf", simplotmap, limitsize = FALSE, base_height = 10)

```

Annexe 7. Script bash pour isoler les gènes variants

```
For gene in /file_directory/*.fa
do

perl /file_directory/nremove.pl -t fasta -f $gene -c 1.0 -i 1.0 -m

done

mv /file_directory/*.out /file_directory/variant_positions/

#concatenate genes of the family
seqkit concat \file_directory\genes_variant_concat_Chr{number}.fa
```

Annexe 8. Poster présenté au International *Toxoplasma* Congress XV (Toxo XV), Quindio, Colombie (juin 2019)

205

DID MARITIME TRADE BETWEEN EUROPE AND WEST AFRICA INFLUENCE *T. GONDII* GENETIC DIVERSITY?

Université de Limoges
contact: azra.hamidovic@unilim.fr +336 29 91 37 22

Thursday 20th June 2019

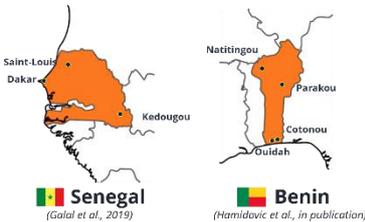
Azra HAMIDOVIĆ¹, Jonas R. ETOUGBETCHE², Lokman GALAL¹, Aretas B. N. TOUNOUHEWA³, Gauthier DOBIGNY^{2,4}, Gualbert HOUEMENO², Honoré DA ZOCLANCLOUNON⁵, Richard AMAGBEGNON⁶, Anatole LALEYE⁵, Nadine FIEVET⁷, Marie-Laure DARDÉ^{1,8}, Aurélien MERCIER^{1,8}

INSERM UMR S 1204 Neurobiologie Trophique, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Faculté de Médecine, Université de Limoges, Limoges 87025, France; ¹École Polytechnique d'Abomey-Calavi, Université d'Abomey-Calavi, Cotonou (BP2009), Bénin; ²Communauté Disease Research Unit (CDRU) University of Abomey-Calavi, Cotonou, Bénin; ³ICRAG, IRD, CIRAD, INRA, Manguelins SupAgro, Univ. Montpellier, Montpellier, France; ⁴Laboratoire d'Expérimentation Animale, Unité de Biologie Humaine, Faculté des Sciences de la Santé, Université d'Abomey-Calavi, Cotonou, Bénin; ⁵Laboratoire de biologie médicale, Centre Hospitalier Universitaire de la Médecine et de l'Odontologie (CHU-ME), DIBP 107, Cotonou, Bénin; ⁶MFRIT, IRD, Université Paris 5, Sorbonne Paris Cité, Paris, France; ⁷Centre d'Etude et de Recherche sur la Paludisme Associé à la Grossesse et à l'Enfance (CERPAGE), Cotonou, Bénin; ⁸Centre National de Référence Toxoplasme/Toxoplasme Biological Resource Center, CHU Limoges, 87042 Limoges, France

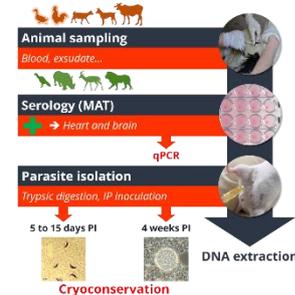
Through bird migrations to colonial and current international trades, Europe and Africa share a long history of exchanges, potentially of pathogens. We used *Toxoplasma gondii*, the world-widely famous parasite, to study the influence of maritime trade on *T. gondii* genetic diversity in Senegal and Benin, two countries with a common colonialism background.

METHODS

Sampling sites:



Protocol:



Genetic analyses:

Strain genotyping
Genetic characterization with a 15-microsatellite (MS) multiplex PCR using an automatic sequencer and the software Genemapper [1]

Population structure analysis
Neighbor-joining tree of *T. gondii* genotypes based on microsatellite sequences to study spatial analysis of the parasite genetic diversity

Genetic clustering
Using the discriminant analysis of principal components (DAPC)

RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1: Tree made with Neighbor-joining method with genotypes from Senegal, Benin, France, Portugal, Brazil, Martinique and French Guyana

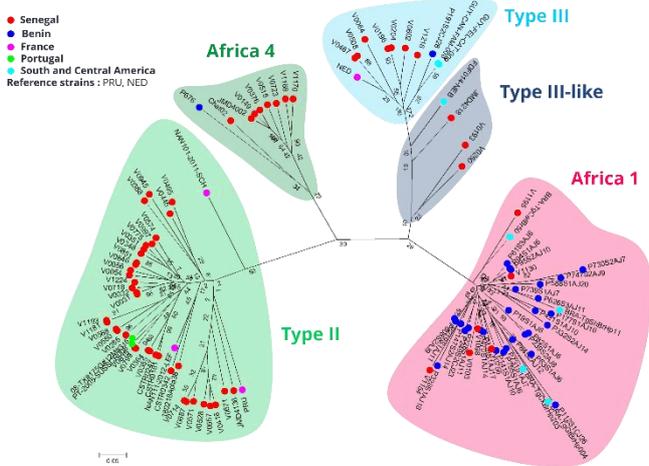


Figure 2: Geographical distribution of Senegalese and Beninese *T. gondii* clonal lineages and strains

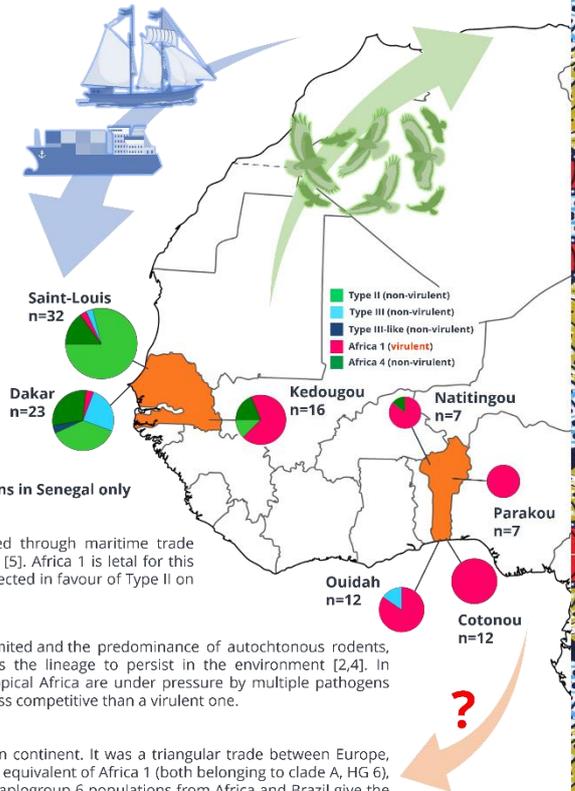
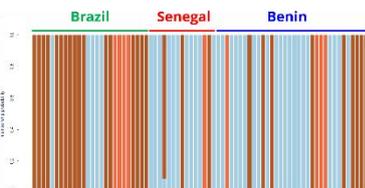


Figure 3: Genetic clustering of *T. gondii* populations of the Africa 1 lineage (haplogroup 6) from Brazil, Senegal and Benin using DAPC



- Differences between inland/port regions in Senegal only
- **Type II in Senegal:** *Mus musculus domesticus* was introduced through maritime trade and has invaded Senegal from the coast [5]. Africa 1 is lethal for this host. Thus, this genotype was counterselected in favour of Type II on the coast [2,3].
- **No Type II in Benin : Why?** The invasion by the domestic mouse is limited and the predominance of autochthonous rodents, which are resistant to Africa 1, enables the lineage to persist in the environment [2,4]. In addition, immune system of hosts in tropical Africa are under pressure by multiple pathogens and therefore, a non-virulent lineage is less competitive than a virulent one.
- **What if we look further?** Colonial trade did not stop to the African continent. It was a triangular trade between Europe, Africa and South America. Brazilian 1, the equivalent of Africa 1 (both belonging to clade A, HG 6), is found in Brazil. Structure analyses of haplogroup 6 populations from Africa and Brazil give the proof of trans- and intercontinental exchanges.

CONCLUSION

- An obvious influence of the maritime trade on the trans- and intercontinental history of *T. gondii*
- Detection of potential strain introgressions and evolutive history will require the use of genomics



References:
1. Azenberg D et al. J Clin Microbiol. 2010 Dec;48(12):4641-5.
2. Galal L et al. Int J Parasitol. 2019 Mar;49(3-4):267-275.
3. Galal L et al. PLoS. 2019 Jun; in press.
4. Hussen MA et al. Int J Parasitol. 2019 Jun;49(1):63-70.
5. Lippens C et al. Heredity (Edinb). 2017 Aug;119(2):64-75.

Comprendre la diversité génétique de *Toxoplasma gondii* au Bénin au travers de ses hôtes et de son génome : des influences humaines et environnementales

L'Europe, l'Afrique et l'Amérique du Sud partagent une longue histoire d'échanges commerciaux, qui ont potentiellement été associés à des échanges de pathogènes. Nous avons utilisé *Toxoplasma gondii*, parasite ubiquiste par excellence dont la diversité génétique semble être structurée géographiquement, pour étudier l'influence du commerce colonial sur cette diversité en Afrique de l'Ouest. Une précédente étude au Sénégal a montré une influence claire de l'Europe sur la diversité du toxoplasme sur la côte Ouest du pays. De ce fait, nous avons décidé d'étudier la diversité génétique de *T. gondii* au travers d'un autre pays de l'Afrique de l'Ouest ayant eu une histoire coloniale intense, le Bénin. Pour cela, nous avons isolé des souches de *T. gondii* à partir d'animaux domestiques (des volailles, bons bioindicateurs de la circulation de souches dans l'environnement) mais aussi de rongeurs, proies privilégiées des hôtes définitifs, les félidés. Le génotypage par microsatellites a montré une prédominance du génotype autochtone Africa 1 sur l'intégralité du territoire béninois, hautement virulent chez certains rongeurs. Grâce à des analyses de génétique des populations sur ces souches, nous avons pu en partie imaginer l'histoire évolutive du parasite et la manière dont celle-ci a influencé la structure des populations actuelles et de leurs hôtes dans cette partie de l'Afrique. Mais la traite négrière a continué jusqu'en Amérique du Sud et l'analyse de génomes Africa 1 et de souches brésiliennes semblent suggérer qu'il y ait eu des introgressions de portions Africa 1 dans le génome des souches brésiliennes. Ceci serait le résultat de la traite négrière et aurait aujourd'hui un impact sur la virulence de ces souches et notamment sur la clinique des toxoplasmoses humaines. Les suites de ces travaux devront se pencher sur le rôle de l'immunité des rongeurs béninois face à une infection toxoplasmique, l'étude de génomes de *T. gondii* dans l'idée d'élucider les histoires évolutives récentes et passées du parasite et de relier cela à la toxoplasmose humaine.

Mots-clés : *Toxoplasma gondii*, Génétique des Populations, Epidémiologie, Génomique

Understanding *Toxoplasma gondii* genetic diversity in Benin through its hosts and genomics: human and environmental influences

Through international trades, Europe, Africa and South America share a long history of exchanges, potentially associated with exchanges of pathogens. We used *Toxoplasma gondii*, the worldwide parasite with a geographical structuration of its global population to study the influence of colonial trade on *T. gondii* genetic diversity in West-African countries. Previous data from Senegal showed a clear influence of Europe on the diversity on the coastal area. We therefore decided to study *T. gondii* genetic diversity in Benin, another West-African country with a more intense colonial history. By isolating *T. gondii* strains from domestic animals (from poultry, good bioindicators of the parasite presence in an environment) but also from DNA detected in rodents (preferred preys of felids) captured in Cotonou, we showed a predominance of the Africa 1 genotype by 15 microsatellites genotyping all over Benin, an autochthonous genotype highly virulent in certain rodent species. With population genetics analyses on these samples, we could imagine the recent evolutive history and how the actual parasite population structure and hosts were influenced in that part of Africa. However, the triangular trade continued to South America and especially Brazil where the Africa 1 genotype was also detected. The genome analyses of non-Africa 1 Brazilian strains suggested potential Africa 1 portions introgressions in their genome. That would be the result of the extensive exchanges during the slave trade and would have an impact today on the parasite virulence and in particular on human toxoplasmosis. The continuing work should focus on studying the Beninese rodents immunology response against *T. gondii*, the study of *T. gondii* genomes with the idea to elucidate the past and recent evolutive histories of the parasite and how it is relate to human toxoplasmosis.

Keywords : *Toxoplasma gondii*, Population Genetics, Epidemiology, Genomics

